



Impact du t-PA sur les taux cérébraux de BDNF en conditions physiologiques et sur les taux circulants en conditions ischémiques : études chez l' Homme et chez l'animal

Marion Rodier

► To cite this version:

Marion Rodier. Impact du t-PA sur les taux cérébraux de BDNF en conditions physiologiques et sur les taux circulants en conditions ischémiques : études chez l' Homme et chez l'animal. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Bourgogne, 2014. Français. NNT : 2014DIJOS054 . tel-01134146

HAL Id: tel-01134146

<https://theses.hal.science/tel-01134146>

Submitted on 23 Mar 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE BOURGOGNE
Ecole Doctorale Environnements – Santé – STIC

THESE

**Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BOURGOGNE**

Discipline : Sciences de la Vie

par

Marion RODIER

Présentée et soutenue publiquement le 9 Décembre 2014

**Impact du t-PA sur les taux cérébraux de BDNF en conditions
physiologiques et sur les taux circulants en conditions ischémiques.
Etudes chez l'Homme et chez l'animal**

Directeur de thèse Dr. Philippe Garnier

Co-encadrante Pr. Christine Marie

JURY

Pr. Sébastien Faure	Examineur
Pr. Yannick Béjot	Examineur
Dr. Valérie Besson	Rapporteur
Pr. Denis Vivien	Rapporteur

UNIVERSITE DE BOURGOGNE
Ecole Doctorale Environnements – Santé – STIC

THESE

**Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BOURGOGNE**

Discipline : Sciences de la Vie

par

Marion RODIER

Présentée et soutenue publiquement le 9 Décembre 2014

**Impact du t-PA sur les taux cérébraux de BDNF en conditions
physiologiques et sur les taux circulants en conditions ischémiques.
Etudes chez l'Homme et chez l'animal**

Directeur de thèse Dr. Philippe Garnier

Co-encadrante Pr. Christine Marie

JURY

Pr. Sébastien Faure Examineur

Pr. Yannick Béjot Examineur

Dr. Valérie Besson Rapporteur

Pr. Denis Vivien Rapporteur

« Une personne qui n'a jamais commis d'erreur n'a jamais tenté d'innover »

Albert Einstein

REMERCIEMENTS

A Madame Valérie Besson, Maître de Conférences à l'Université Paris Descartes, et Monsieur Denis Vivien, Professeur à l'Université de Caen qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail en tant que rapporteurs. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma gratitude.

A Monsieur Sébastien Faure, Professeur à l'Université d'Angers, qui a accepté de juger ce travail en tant qu'examineur et qui m'a soutenue pour l'obtention ce poste d'ATER à l'université d'Angers. Qu'il trouve ici le témoignage de ma reconnaissance.

Merci également à Monsieur Yannick Béjot, PU-PH au CHU de Dijon, d'avoir spontanément accepté de participer à ce jury. Mais surtout merci de m'avoir intégrée dans cette étude qui restera une expérience très enrichissante tant sur le plan professionnel qu'humain.

Mes remerciements se tournent maintenant vers tous ceux qui m'ont aidé à mener à bien ce projet

A Monsieur Philippe Garnier, Maître de Conférences en Génie Biologique à l'IUT de Dijon. Merci de m'avoir assistée pendant ces 4 années passées au laboratoire. Merci pour ta disponibilité, pour ton soutien et tes conseils. J'ai énormément appris à tes côtés.

A Madame Christine Marie, Professeur de Physiologie à la Faculté de Pharmacie de Dijon. Je tiens à vous témoigner toute ma reconnaissance pour m'avoir accueillie dans votre équipe, d'abord en SIR puis en Master 2 et en Doctorat. Merci de m'avoir guidée et épaulée dans ce travail de thèse et dans mes choix de carrière.

A Monsieur Claude Mossiat, Ingénieur à la Faculté de Pharmacie de Dijon, pour m'avoir formée aux techniques d'expérimentation animale, et pour son aide précieuse.

A l'ensemble de l'équipe INSERM U1093 que j'ai pu côtoyer ces quatre dernières années : le Pr Anne Tessier, Aurore Quirié, Hayat Banoujaafar, Alexandre Madinier, Nicolas Pernet, Jean-Michel Hlubina et Nathalie Mélanie.

A Alice Monnier, qui rentre dans pas mal de catégories de ces remerciements : collègues, amis, famille...J'y reviendrai... Merci pour tout !

Aux « chalonnais » : Matt, Vincent, Fab, Peevo, Chloé, Max, Steve, Aurore, James, Elodie, Rémi, Kirsten, Joe, Anne-So, Gwen, Poupette...Merci pour tous ces moments passés ensemble !

A Matt, Tarik, Julie, Seb (Jojo), Clem, Claire, Clairos. Merci pour tous ces apéros au Mirande, ces parties de « coinche », ces discussions scientifiques...et moins scientifiques...je soupçonne Tolkien de s'être retourné plusieurs fois dans sa tombe !

Aux IPR (copains de galères) : Alice (et Alex, quand même), Antoine, Kader, Martin et Alicia...Merci pour ces années d'internat, et bon courage à vous !

A Noémie, ma plus vieille amie, merci pour toutes nos aventures : la musique, le camping, la planche à voile, l'adolescence...Merci d'avoir toujours été là dans les bons et les mauvais moments.

A ma belle-famille : Elisabeth & Gilles, Elsa & Olivier, Alice & Alex (Encore eux ?). Merci de m'avoir si chaleureusement accueillie dans votre famille.

A mon grand-père, pour son oreille attentive...

A mon frère et ma sœur, Stéphane & Aurélie, et leur valeur ajoutée, Estelle & Vincent... Merci de votre soutien et surtout d'avoir tenté de comprendre le fonctionnement, pas toujours simple, de mes longues années d'études... Je n'ai peut-être pas encore trouvé LA molécule, mais je continue de chercher !

A mes neveux et ma nièce : Paul, Jean, Jules et Jeanne. J'espère que cette thèse vous donnera l'envie de réaliser vos rêves.

A mes parents, merci de m'avoir permis d'en arriver là, merci pour votre soutien et votre écoute.

A ma grand-mère...J'espère que tu es fière de moi...

A Benjamin, merci pour ton soutien, ta présence, ton affection et tout ce que tu m'apportes au jour le jour...Je t'aime.

Résumé

L'objectif de ce travail a été de tester l'hypothèse selon laquelle l'effet bénéfique de l'administration de la forme recombinante de l'activateur tissulaire du plasminogène (rt-PA) chez le patient victime d'un accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique ne résulte pas uniquement de son action fibrinolytique mais aussi de sa capacité à augmenter le brain-derived neurotrophic factor (BDNF) dans le cerveau. Dans ce but, nous avons conduit une première étude visant à évaluer chez l'animal sain, l'effet du rt-PA sur les taux cérébraux de BDNF. Dans une seconde approche, nous avons étudié l'effet du rt-PA sur les taux sériques de BDNF chez le patient victime d'un AVC ischémique et chez l'animal soumis à une ischémie cérébrale focale. Le sang a été prélevé chez l'Homme à l'admission (J0), J1, J7 et J90 après l'AVC, et chez le Rat avant et après (1h, 4h et 24h) l'ischémie. Le BDNF a été mesuré dans le cerveau par technique de Western blot et dans le sang par technique ELISA. Dans les deux études le rt-PA (Actilyse®) a été administré sous forme d'un bolus suivi d'une perfusion d'une heure. La première étude montre que 1) le rt-PA augmente les taux de BDNF dans l'hippocampe, 2) le traitement par MK801 (un antagoniste des récepteurs NMDA) mais pas par l'acide tranexamique (un inhibiteur de la plasmine) annule l'effet du rt-PA sur les taux de BDNF. La deuxième étude met en évidence que 1) la récupération neurologique est meilleure chez les patients recevant le rt-PA, 2) le traitement par rt-PA augmente les taux sériques de BDNF à J1 et J7 chez l'Homme, mais ne modifie pas les taux sanguins de BDNF chez l'animal, 3) les taux de BDNF ne sont pas corrélés à la récupération neurologique mais sont inversement corrélés au score cardiovasculaire du patient. En conclusion, nos résultats suggèrent que le rt-PA peut exercer un effet protecteur extra-fibrinolytique en augmentant les taux de BDNFm par une potentialisation de l'activité glutamatergique. Même si le rt-PA induit une meilleure récupération neurologique et augmente les taux circulants de BDNF chez les patients victimes d'un AVC, l'absence de corrélation entre ces deux paramètres n'est pas en faveur de l'utilisation du BDNF circulant comme un marqueur prédictif de récupération neurologique, mais pourrait être un reflet de la capacité de l'endothélium à sécréter le BDNF.

Mots clés : rt-PA, BDNF, TrkB, NMDA, AVC, Récupération fonctionnelle, Santé cardiovasculaire.

Abstract

Our objective was to test the hypothesis that the beneficial effect of the administration of the recombinant form of tissue plasminogen activator (rt-PA) in ischemic stroke patient not only results from its fibrinolytic activity but also from its ability to increase brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the brain. To this end, we conducted an initial study to evaluate the effect of rt-PA on brain BDNF levels in healthy animals. In a second study, we investigated the effect of rt-PA on serum BDNF levels in ischemic stroke patients and in animals subjected to permanent focal cerebral ischemia. Blood samples were obtained from patient on admission (D0), D1, D7 and D90 after stroke and in rats before and after (1h, 4h and 24h) ischemia. BDNF was measured in the brain by Western blot and in the blood by ELISA. In both studies, the rt-PA (Actilyse®) was administered as a bolus followed by an infusion of one hour. The first study evidences that 1) rt-PA increases the BDNF levels in the hippocampus, 2) treatment with MK801 (a NMDA receptor antagonist) but not with tranexamic acid (a plasmin inhibitor) canceled the effect of rt-PA on BDNF levels. The second study exhibits that 1) neurological recovery was higher in the patients receiving rt-PA, 2) treatment with rt-PA increases serum BDNF at D1 and D7 in patients, but does not change the blood BDNF levels in animals, 3) BDNF levels are not correlated with neurological recovery but are inversely correlated to the patient cardiovascular score. In conclusion, our results suggest that rt-PA may have a protective extra-fibrinolytic effect by increasing in BDNF levels through a potentiation of glutamatergic pathway. Although rt-PA induces a better neurological recovery and increases circulating BDNF levels in stroke patients, the lack of correlation between these two parameters is not in favor of using circulating BDNF as a predictive marker of neurological recovery, but could be a reflect of the endothelium ability to synthesize BDNF.

Key words : rt-PA, BDNF, TrKB, NMDA, AVC, functional recovery, cardiovascular health status.

Table des matières

LISTE DES ABBREVIATIONS

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

INTRODUCTION

PARTIE 1 : ETAT DE L'ART

I.	L'ACCIDENT VASCULAIRE CEREBRAL	19
A.	Définition et types d'accidents vasculaires cérébraux	19
B.	L'infarctus cérébral	20
1.	Formation.....	20
2.	Physiopathologie de l'AVC	21
C.	Pronostic	29
1.	Données épidémiologiques.....	29
2.	Facteurs de risques	29
3.	Facteurs pronostiques.....	30
D.	Diagnostic et Prise en charge	32
1.	Diagnostic.....	32
2.	Prise en charge.....	32
E.	Plasticité et récupération fonctionnelle	34
1.	L'activité physique	34
2.	La stimulation magnétique transcrânienne	35
3.	La thérapie médicamenteuse	35
II.	LE BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR	37
A.	BDNF tissulaire.....	37
1.	Répartition et localisation cellulaire du BDNF dans l'organisme	37
2.	Le gène <i>bdnf</i>	38
3.	Maturation et sécrétion du BDNF	40
B.	BDNF circulant	42
1.	Origine cellulaire du BDNF circulant	42
2.	Déterminants du BDNF circulant	44
C.	Mécanismes d'action et rôles du BDNF dans l'organisme.....	45
1.	Les récepteurs du BDNF	45
2.	Effets centraux du BDNF mature	49
3.	Effets centraux du proBDNF.....	50
4.	Effets centraux du pro-domaine du BDNF	50
D.	Rôle du BDNF en conditions ischémiques	51
1.	Effets de l'ischémie sur les taux cérébraux de BDNF.....	51
2.	Effets de l'ischémie sur les taux circulants de BDNF.....	53
3.	Rôle du BDNF en cas d'ischémie	54

III. L'ACTIVATEUR TISSULAIRE DU PLASMINOGENE	56
A. Données générales concernant le t-PA	56
1. Structure du t-PA	56
2. Sources cellulaires du t-PA.....	58
3. Régulation de la sécrétion de t-PA.....	58
4. Les inhibiteurs du t-PA	60
5. Les récepteurs du t-PA	62
6. Rôle historique du t-PA dans la fibrinolyse	63
B. t-PA, Unité neurovasculaire et Barrière hémato-encéphalique	65
1. Passage de la BHE par le t-PA.....	65
2. t-PA et rupture de la BHE	66
3. Mécanismes mis en jeu.....	67
C. Fonctions centrales du t-PA	70
1. Rôle du t-PA dans la mise en place du réseau synaptique	70
2. Rôle du t-PA dans la plasticité synaptique	71
3. Rôle du t-PA dans la modulation de la signalisation glutamatergique	72
4. Rôle du t-PA dans les phénomènes apoptotiques.	80
5. Rôle du t-PA dans les phénomènes inflammatoires	82
D. Utilisation du t-PA en thérapeutique	85
1. Etudes cliniques	85
2. Conditions d'utilisation du rt-PA.....	86
3. Effets indésirables du rt-PA.....	87
E. A la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques	88
1. Les nouveaux agents fibrinolytiques.....	88
2. Association d'agents pharmacologiques au rt-PA	89
F. t-PA et BDNF	93

PARTIE 2 : MATERIELS ET METHODES

I. Techniques physiologiques	98
A. Animaux	98
B. Protocole pharmacologique	98
C. Modèle d'ischémie focale permanente par photothrombose	100
1. Réalisation de l'ischémie.....	100
2. Rinçage des cerveaux par voie transcardiaque.....	101
3. Prélèvement des tissus cérébraux	101
4. Prélèvement de sang	101
II. Techniques biochimiques	102
A. Extraction des protéines.....	102

B.	Dosage des protéines	102
C.	Technique de Western Blotting	102
1.	Préparation des échantillons	103
2.	Préparation des gels d'électrophorèse	103
3.	Réalisation de l'électrophorèse	103
4.	Transfert.....	104
5.	Immunoblotting et révélation.....	105
D.	Technique ELISA pour le dosage du BDNF.....	107
1.	Préparation des échantillons tissulaires et circulant pour dosage du BDNF	107
2.	Réalisation des dosages du BDNF circulant et tissulaire.....	107
E.	Technique de fluorimétrie pour mesure d'activité enzymatique.....	108
1.	Préparation des échantillons tissulaires pour mesure des activités t-PA et Plasmine	109
2.	Réalisation.....	109
III.	Etude clinique	110
1.	Objectif principal.....	110
2.	Objectifs secondaires	110
B.	Méthodes.....	111
1.	Schéma d'étude	111
2.	Population étudiée.....	111
3.	Critères de jugement	112
C.	Variables d'intérêt.....	112
1.	Données sociodémographiques :.....	112
2.	Autonomie et dépendance physique préalable à l'infarctus cérébral :.....	112
3.	Antécédents médicaux :.....	112
4.	Données concernant l'AVC :	113
D.	Déroulement de l'étude	113
IV.	Analyse statistique des résultats	115
PARTIE 3 : PRESENTATION DES TRAVAUX		
I.	Etude 1 : Effet d'une perfusion de rt-PA sur le métabolisme du BDNF mature chez des rats non ischémiés. Analyse des mécanismes mis en jeu.....	118
A.	Contexte et objectifs.....	119
B.	Méthodes.....	119
C.	Principaux résultats.....	119
II.	Etude 2 : Effet de l'administration de t-PA sur les taux circulants de BDNF. Etude chez l'Homme et chez le Rat.	130
A.	Contexte et objectifs.....	131
B.	Méthodes.....	131
C.	Principaux résultats.....	132

D. Résultats complémentaires	158
I. Etude 1	160
II. Etude 2.....	163

PARTIE 4 : DISCUSSION GENERALE ET PERSEPECTIVES

BIBLIOGRAPHIE

Liste des abréviations

Aa : acide aminé

Ac : Anticorps

ADAMTS-4 : désintégrines de type 4 et de métalloprotéinases comportant des motifs thrombospondine

AIT : Accident Ischémique Transitoire

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ARNm : ARN messenger

ATP : Adénosine triphosphate

AVC : Accident Vasculaire Cérébral

BDNF : Brain-Derived Neurotrophic Factor

BDNFm : Brain-Derived Neurotrophic Factor mature

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

CaRF : Calcium-Responsive transcription Factor

COX : Cyclo-Oxygénase

CREB : cAMP Response Element Binding protein

CRP : Protéine C Réactive

EGF : Epidermal Growth Factor

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

EMA : European Medicines Agency

eNOS : endothelial Nitric Oxide Synthase

Erk ½ : Extracellular signal-regulated kinase ½

FDA : Food and Drug Administration

FSS : Fatigue Severity Scale

HAS : Haute Autorité de Santé

HFS : High Frequency Stimulation

HRP : Horseradish Peroxydase

ICAM : Intracellular Adhesion Molecule

IL-6 : Interleukine 6

iNOS : inducible Nitric Oxide Synthase

KO : Knock-Out

LCR : Liquide Céphalo-Rachidien

LFS : Low Frequency Stimulation

L-NMMA : N^G monométhyl-L-arginine
 LRP : Low-Density Lipoprotein Receptor-related Protein
 LTD : Long-Term Depression
 LTP : Long-Term Potentiation
 MADRS : Montgomery and Asberg Depression Rating Scale
 MCAO : Middle Cerebral Artery Occlusion
 MEC : Matrice Extracellulaire
 mGluR : récepteur métabotrope au glutamate
 MMP : Matrix Metalloproteinase
 MMSE : Mini-Mental State Examination
 MoCA : Montreal Cognitive Assessment
 NF-κB : Nuclear Factor κB
 NGF : Nerve Growth Factor
 NIHSS : National Institute of Health Stroke Scale
 NMDA : N-Methyl-D-aspartate
 NMDAR : N-Methyl-D-aspartate Receptors
 nNOS : neuronal Nitric Oxide Synthase
 NRAGE : Neurotrophin Receptor p75 Interacting MAGE homologue
 NRIF : Neurotrophin Receptor-Interacting Factor
 NO : Nitric Oxide
 NOS : Nitric Oxide Synthase
 NSE : Neuron Specific Enolase
 NT3 : Neurotrophin 3
 NT4 : Neurotrophin 4
 p75^{NRT} : pan 75 neurotrophin receptor
 PAI-1 : Plasminogen Activator Inhibitor 1
 PC 1/7 : Pro-protéine convertases 1 et 7
 PDGF-CC : Platelet-Derived Growth Factor - CC
 PGS : Protéoglycanes Chondroïtine Sulfate
 PLA₂ : Phospholipase A₂
 PLC-γ : Phospholipase C-gamma
 PMN : Polymorphonucléaire
 PN-1 : protéase nexine 1
 RL : Radicaux Libres
 RNS : Reactive Nitrogen Species

ROS : Reactive Oxygen Species
RTG : Réseau Trans-Golgien
SC1 : Schwann Cell factor 1
SMT : Stimulation Magnétique Trans-crânienne
SNC : Système Nerveux Central
SorCS2 : Sortilin-related Vps10p-domain sorting receptor 2
TBS : Tris Buffer Saline
TBS-T : TBS-Tween 20
TH : Transformation Hémorragique
TMB/E : 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine
TNF : Tumor Necrosis Factor
(r)t-PA : (Recombinant)Tissue Plasminogen Activator
(p / FL)-TrkB : (phosphorylated / Full Length) Tropomyosin related kinase B
UNV : Unité Neurovasculaire
u-PA : Urokinase
USP : Upstream Stimulatory Factor
UTP : Uridine triphosphate
VCAM : Vascular Cell Adhesion Molecule
VDAC : Voltage-Dependent Anion Channel
XO : Xanthine Oxydase

Liste des Figures

Figure 1 - Evolution de la mort cellulaire et de la pénombre ischémique au cours du temps.	21
Figure 2 - Chronologie de la cascade biochimique post-ischémique. D'après Doré et al., 2012.	22
Figure 3- Processus inflammatoire post-ischémique. D'après Wang <i>et al.</i> , 2007.	26
Figure 4 - Schéma récapitulatif des différents mécanismes impliqués dans la réaction en chaîne aboutissant à la mort cellulaire post-ischémique.	28
Figure 5- Symptômes cliniques des AVC ischémiques.	32
Figure 6 - Métabolisme du BDNF d'origine neuronal.	37
Figure 7 - les différents transcrits du gène <i>bdnf</i> chez le Rat. D'après Aid <i>et al.</i>	39
Figure 8 - Représentation schématique des différents domaines de la protéine BDNF.	40
Figure 9 - Métabolisme neuronal du BDNF, et les différents mécanismes cellulaires pouvant être impliqués dans le clivage du proBDNF en BDNFm.	41
Figure 10 - Schéma représentatif du clivage du proBDNF donnant lieu à la libération du BDNFm et du pro-domaine.	46
Figure 11 - Voies de signalisation déclenchées par l'activation du récepteur TrkB suite à la fixation du BDNFm. D'après Fenner (2012).	47
Figure 12 - Voies de signalisation déclenchées par l'activation des récepteurs $p75^{NRT}$ /Sortiline suite à la fixation du proBDNF.	49
Figure 13- Structure et fonctions des différents domaines du t-PA (D'après Vivien <i>et al.</i> , 2011).	57
Figure 14 - Stimulation de la sécrétion de t-PA par l'endothélium vasculaire.	60
Figure 15- Action fibrinolytique du t-PA.	64
Figure 16 - Principales hypothèses mécanistiques impliquant le t-PA dans la fragilisation de la barrière hémato-encéphalique à la suite d'un épisode ischémique. D'après Montagne, 2012.	67
Figure 17 - Schéma récapitulatif des principaux mécanismes moléculaires de la fibrinolyse (1) et de l'implication du (r)t-PA (2-6) dans la fragilisation de la BHE.	69
Figure 18 - Principales hypothèses mécanistiques impliquant le t-PA dans la plasticité synaptique... ..	72
Figure 19- Les récepteurs ionotropiques du Glutamate (d'après Lüscher C. et Malenka R. C. 2004). .	72
Figure 20 - Assemblage des sous-unités des NMDAR.	74
Figure 21- Evolution du profil d'expression des sous-unités GluN des NMDAR dans le cerveau murin au cours du développement, de la naissance à l'âge adulte. D'après Paoletti et al. 2013.	74
Figure 22 - Schéma représentatif des deux mécanismes impliqués dans l'interaction t-PA/GluN1.	77
Figure 23 - Schéma représentatif des deux mécanismes impliqués dans l'interaction t-PA/GluN2B. .	78
Figure 24 - Schéma représentatif des différents mécanismes impliqués dans l'interaction t-PA/GluN2D.	80
Figure 25 - Schéma récapitulatif des différentes cibles du t-PA et des conséquences de ses interactions.	84
Figure 26 - Schéma représentatif de l'hypothèse du déclenchement d'une boucle d'amplification mettant en jeu le (r)t-PA et le BDNF.	96
Figure 27- Schéma récapitulatif des protocoles d'injection des agents pharmacologiques.	99
Figure 28-Principe de l'ischémie focale permanente par photothrombose.	100
Figure 29-Protocole de Western blotting.	105
Figure 30-Principe de détection du kit ECL+.	106
Figure 31 - Echelle de score de l'ESC pour le calcul du score cardiovasculaire.	113
Figure 32- Design expérimental de l'étude	115

Liste des tableaux

Tableau 1 – Classification TOAST des sous-types d'infarctus cérébraux.....	20
Tableau 2 - Tableau résumant les marqueurs de mauvais pronostic clinique de l'AVC.	31
Tableau 3 - Résumé de l'échelle NIHSS.	33
Tableau 4 - Récapitulatif de l'ensemble des facteurs déterminants des taux de BDNF circulants.....	45
Tableau 5 - Tableau récapitulatif des différentes études portant sur l'effet de l'ischémie sur les taux circulants de BDNF chez l'Homme.	53
Tableau 6- Tableau récapitulatif des différents agents pharmacologiques pouvant être associés au rt-PA dans le but de diminuer sa toxicité.	93
Tableau 7- Récapitulatif des agents pharmacologiques utilisés et de leur mode d'administration.	99
Tableau 8- Description des conditions de Western blotting en fonction de la protéine d'intérêt.	107
Tableau 9- Description des conditions de fluorimétrie en fonction de l'enzyme d'intérêt.	110

INTRODUCTION

L'accident vasculaire cérébral (AVC) est la première cause de handicap acquis et la troisième cause de mortalité dans les pays industrialisés. Dans 80% des cas, l'AVC résulte de l'obstruction d'un vaisseau cérébral par un caillot sanguin fibrineux. En dépit de nombreuses études ayant caractérisé la physiopathologie de l'AVC chez l'animal, il n'existe qu'un seul traitement médicamenteux curatif de l'AVC d'origine ischémique : la forme recombinante de l'activateur tissulaire du plasminogène (rt-PA) commercialisée sous le nom d'Altéplase ACTILYSE®. Le traitement par rt-PA va avoir pour objectif de cliver le plasminogène en plasmine, qui va à son tour dégrader la fibrine en produits de dégradation de la fibrine, aboutissant ainsi à la recanalisation du vaisseau par destruction du caillot. Le traitement par le rt-PA devant être administré dans les 4h30 qui suivent le début des signes, seuls 5% des patients sont éligibles à la fibrinolyse. Aussi, de nombreux travaux ont été consacrés à la recherche d'autres stratégies pouvant améliorer la récupération fonctionnelle des patients victimes d'un AVC.

Devant l'échec des stratégies de neuroprotection (réduction du volume d'infarctus), les recherches se sont tournées vers les stratégies visant à favoriser la neuroplasticité, c'est-à-dire le remodelage des circuits neuronaux épargnés par la lésion. L'une des principales cibles de ces stratégies est le brain-derived neurotrophic factor (BDNF), un peptide appartenant à la famille des neurotrophines. Comme tout peptide, il est synthétisé sous forme d'un précurseur de haute masse moléculaire, le pré-proBDNF qui va ensuite être clivé successivement en proBDNF puis en BDNF mature (BDNFm). A l'échelle cellulaire, cette forme mature va activer les récepteurs TrkB et favoriser la synaptogenèse, la neurogenèse, la croissance axonale, et même la vasculogenèse. Le BDNFm est également mis en jeu dans le déclenchement et le maintien de la potentialisation à long terme (LTP) et dans la survie neuronale en conditions cytotoxiques. A l'échelle fonctionnelle, le BDNFm est impliqué dans les processus d'apprentissage et de mémoire, et dans la régulation de l'humeur et du comportement alimentaire.

Au milieu des années 2000, il a été mis en évidence *in vitro* que la plasmine est capable de cliver le proBDNF en BDNFm. *In vivo*, il a été montré que les stratégies capables d'augmenter le BDNF cérébral sont fréquemment associées à une augmentation de l'activité t-PA. C'est le cas des stratégies telles que l'environnement enrichi, la thérapie par électrochocs ou encore l'activité physique. Par ailleurs, le t-PA est désormais connu comme

une molécule aux effets pléiotropes. Il est capable, entre autre, d'activer les récepteurs NMDA et donc de stimuler les neurones. Sachant que la synthèse et la sécrétion neuronale de BDNF est activité-dépendante, l'augmentation de BDNF observée dans ces études pourrait mettre en jeu un mécanisme dépendant de la plasmine et/ou un mécanisme dépendant de l'activation des récepteurs NMDA. Ainsi, le t-PA pourrait jouer un rôle dans le processus de neuroplasticité grâce à l'activation du plasminogène et/ou grâce à son effet neuromodulateur. Ces données sont en accord avec une méta-analyse de 2008 qui s'est intéressée au lien entre bénéfices fonctionnels du rt-PA et recanalisation du vaisseau occlus. En effet, les résultats de cette étude montrent que l'administration de rt-PA est associée à une meilleure récupération fonctionnelle du patient, mais conduit à une recanalisation partielle ou totale chez uniquement 61 % des patients. Cette étude est un argument fort qui nous a poussés à émettre l'hypothèse selon laquelle l'amélioration neurologique post-AVC induite par le rt-PA ne signe pas uniquement la réussite de la fibrinolyse mais mettrait en jeu des mécanismes de neuroplasticité impliquant le BDNF.

Afin de déterminer dans quelle mesure le bénéfice neurologique du t-PA chez le patient victime d'un AVC peut impliquer une augmentation des taux cérébraux de BDNF, nous avons conduit deux études :

- La première a eu pour objectif d'évaluer chez le Rat l'impact d'une administration de rt-PA sur les taux cérébraux de BDNF en conditions physiologiques et de déterminer les mécanismes mis en jeu.
- La seconde a eu pour objectif principal d'étudier l'impact de l'administration de rt-PA sur les taux circulants de BDNF, considérés par les neurologues comme le reflet des taux cérébraux, chez le patient victime d'un AVC ischémique et chez le Rat soumis à une ischémie focale photothrombotique. L'objectif secondaire de cette étude a été d'évaluer dans quelle mesure le BDNF circulant pouvait être utilisé comme un marqueur prédictif de l'amélioration post-AVC chez le patient.

Ce manuscrit comprend un état de l'art incluant un rappel sur l'AVC et une revue de la littérature sur le BDNF et le t-PA, la description des méthodes utilisées, la présentation des deux publications issues de nos travaux et enfin une discussion générale qui analyse de façon critique les principaux résultats obtenus.

PARTIE 1 : ETAT DE L'ART

I. L'ACCIDENT VASCULAIRE CEREBRAL

A. Définition et types d'accidents vasculaires cérébraux

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'accident vasculaire cérébral (AVC) se définit comme « un déficit brutal et spontané d'une fonction cérébrale focale ou globale sans autres causes apparentes qu'une cause vasculaire. Les symptômes doivent durer plus de 24 heures. L'évolution peut se faire vers la régression totale ou partielle des déficits fonctionnels, ou vers la mort » (www.who.int). Avec 6 millions de décès par an dans le monde, ils représentent un problème majeur de santé publique avec une morbi-mortalité lourde.

L'AVC peut avoir 2 origines distinctes. On différencie l'AVC d'origine ischémique, résultant de l'occlusion d'un vaisseau sanguin cérébral et aboutissant à une ischémie puis à l'infarctus, et l'AVC d'origine hémorragique, qui est la conséquence de la rupture d'un vaisseau cérébral sous-arachnoïdien ou intraparenchymateux. Dans les pays occidentaux, 80 à 90 % des AVC sont d'origine ischémique.

En fonction de leur étiologie, les infarctus cérébraux sont classés en sous-types, selon la classification « TOAST », qui est la classification la plus utilisée (Adams et al., 1993) (Tableau 1). Environ un tiers des AVC sont liés à l'athérosclérose des grosses artères, un tiers à une embolie cardiaque et un dernier tiers à une autre cause.

Tableau 1 – Classification TOAST des sous-types d'infarctus cérébraux.

Sous-type étiologique	Description	Fréquence
Athéroscléroses des grosses artères	Occlusion ou une sténose (>50%) d'une artère cérébrale majeure ou d'une branche corticale, secondaire à des lésions d'athérosclérose	15-30%
Embolie cardiaque	Au moins une source cardiaque d'embolie identifiée. Les sources cardiaques sont alors divisées en risque élevé et moyen d'embolie	20-25%
Infarctus lacunaire	Atteinte des artérioles de petit calibre (diamètre <400µm). Infarctus de taille <1.5cm à l'imagerie sans source cardiaque d'embolie, ni lésion significative d'athérosclérose des grosses artères identifiée	15-25%
Autres causes	Autres causes rares identifiées sont : dissections artérielles, angéites cérébrales, troubles hématologiques, états d'hypercoagulation, maladies génétiques...	5%
Cause indéterminée	Plusieurs mécanismes peuvent coexister, ou bien aucune cause n'est retrouvée après un bilan étiologique complet ou incomplet	15-30%

B. L'infarctus cérébral

1. Formation

L'infarctus cérébral, c'est-à-dire la destruction complète d'un territoire ischémié, résulte d'une hypoperfusion suffisamment sévère et prolongée. Le volume de l'infarctus évolue dans le temps et dans l'espace. Une phase de maturation va d'abord avoir lieu, au cours de laquelle le volume de l'infarctus va augmenter. Puis, une phase de cicatrisation intervient au cours de laquelle le volume du territoire infarcté régresse après avoir été successivement envahi par la microglie, les monocytes et les astrocytes (Demougeot et al., 2003). A terme, la cicatrice gliale est à peine visible et l'atrophie cérébrale devient le seul témoin de l'infarctus. Au niveau de la lésion, la barrière hémato-encéphalique (BHE) va devenir très perméable à l'eau et aux protéines circulantes. Il en résulte la formation d'un œdème vasogénique pouvant, par phénomène d'engagement, conduire au décès du patient. De même, la dégradation de la lame basale sur laquelle repose les cellules endothéliales formant la BHE peut conduire à des transformations hémorragiques (TH) de l'infarctus.

Lors de l'AVC ischémique, deux zones sont à distinguer au niveau du territoire hypoperfusé : le cœur et la pénombre. Le cœur correspond à la zone où le débit sanguin résiduel est inférieur à 20 % du débit normal et est incompatible avec la survie cellulaire (Dirnagl et al., 1999). La pénombre correspond à la zone où le débit résiduel est compris entre 20 et 40 % du débit pré-ischémique et comprend des cellules dysfonctionnelles mais viables. Ces cellules pourront être sauvées en cas de reperfusion. La pénombre peut représenter jusqu'à plus de 50 % du volume infarcté final (Mergenthaler et al., 2004).

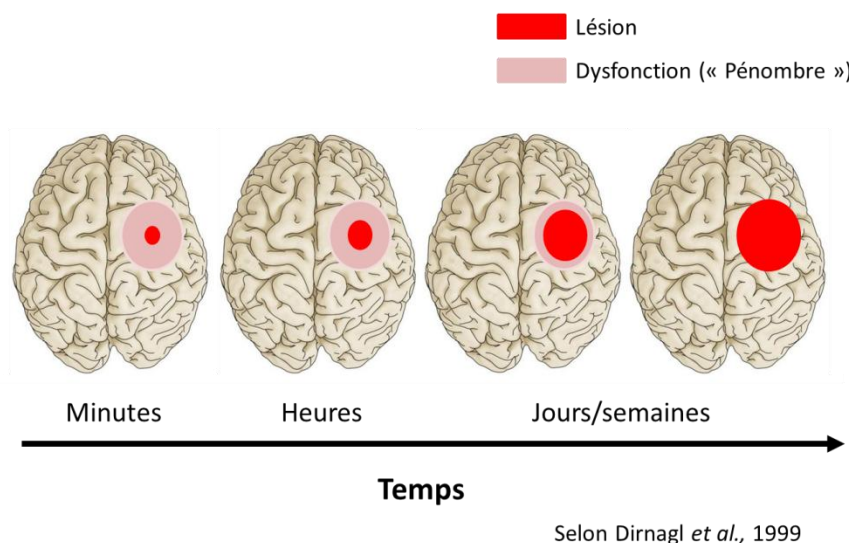


Figure 1 - Evolution de la mort cellulaire et de la pénombre ischémique au cours du temps.

2. Physiopathologie de l'AVC

La diminution du débit sanguin au cours de l'AVC s'accompagne d'une réduction de l'apport en oxygène et en glucose (Gutierrez et al., 2006). Le déficit énergétique qui s'ensuit va être à l'origine d'une acidose tissulaire, de perturbations des flux ioniques et hydriques, d'une excitotoxicité, d'un stress oxydant et d'une réponse inflammatoire. L'ensemble de cette cascade d'évènements va conduire à la mort des cellules composant le parenchyme cérébral (Dirnagl et al., 1999, Lipton, 1999). Néanmoins, le cerveau est capable de mettre en place des processus de protection incluant la neuroprotection et la réparation/régénération. La figure 2 illustre la cinétique des mécanismes lésionnels et protecteurs associés à l'AVC ischémique.

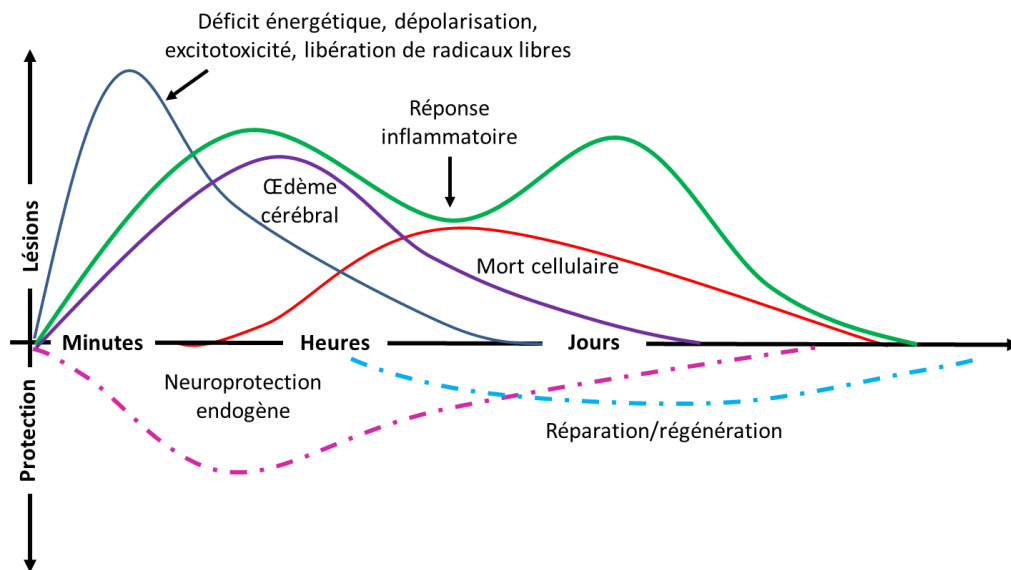


Figure 2 - Chronologie de la cascade biochimique post-ischémique. D'après Doré et al., 2012.

a) Acidose tissulaire

La diminution de l'apport en oxygène aboutit à l'activation de la glycolyse anaérobie, à l'origine d'une accumulation de lactates et de protons (H^+) dans le tissu cérébral. La production de ces éléments chimiques va conduire à une diminution du pH dans les territoires ischémiés (Kintner et al., 2000). La glycolyse anaérobie n'est pas le seul mécanisme impliqué dans l'acidose tissulaire, l'hydrolyse de l'adénosine tri-phosphate (ATP) va également jouer le rôle de pourvoyeur d'ions H^+ .

L'acidose tissulaire déclenche un certain nombre d'évènements cytotoxiques, notamment :

- La formation de radicaux libres (RL) à l'origine du stress oxydant (voir I-B-c),
- L'altération de la synthèse et de la structure de certaines protéines sensibles au pH (Petsko, 2004),
- Le dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale (Kristian, 2004),
- L'entrée de Ca^{2+} dans la cellule, conduisant indirectement à la mort cellulaire (Frelin et al., 1988, Schlue and Dorner, 1992, Yao and Haddad, 2004, Hertz, 2008).

b) Perturbations des flux ioniques et hydriques

Le déficit énergétique compromet le fonctionnement de la Na^+/K^+ ATPase (Doyle et al., 2008). Ce phénomène aboutit à une augmentation de la concentration intracellulaire en

Na^+ et à une libération accrue de K^+ . L'augmentation cytosolique en Na^+ entraîne une entrée d'eau dans la cellule conduisant à sa lyse (œdème cytotoxique) (Siesjo, 1981, Klatzo, 1985).

Parallèlement, le dysfonctionnement des pompes calciques membranaires, l'ouverture des canaux dépendant du potentiel (Siesjo, 1992), l'activation des échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, et enfin l'ouverture du canal ionique des récepteurs NMDA (N-Methyl-D-aspartate), AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthylisozazol-4-propionate) et kaïnate (Szydlowska and Tymianski, 2010), provoque une entrée massive de Ca^{2+} extracellulaire et une libération de Ca^{2+} par le réticulum endoplasmique conduisant à une accumulation de l'ion dans le cytosol. Ce phénomène participe au découplage de la phosphorylation oxydative mitochondriale et induit l'activation d'un certain nombre d'enzymes susceptibles de participer à la mort cellulaire (Yao and Haddad, 2004). L'ouverture des récepteurs au glutamate va également participer au déclenchement du phénomène d'excitotoxicité (Katsura et al., 1994).

c) L'excitotoxicité du glutamate

Comme nous venons de l'évoquer, l'altération de l'homéostasie ionique conduit à une perte du potentiel membranaire des cellules. Au niveau des neurones, cette dépolarisation s'accompagne d'un relargage de nombreux neuromédiateurs, en particulier de glutamate, principal acide aminé excitateur. Le fonctionnement des transporteurs assurant la recapture du glutamate est également altéré, conduisant à une accumulation du neurotransmetteur au niveau synaptique et à une stimulation excessive des récepteurs de type NMDA et AMPA, aggravant les perturbations des flux ioniques et hydriques. Ainsi, de nombreuses études ont cherché à mettre au point des stratégies pharmacologiques permettant de bloquer l'activation de ces récepteurs dans le but de diminuer l'excitotoxicité post-ischémique, et de limiter l'extension de la lésion (Sommer et al., 2006, Tanaka et al., 2007, Zhao et al., 2011).

d) Le stress oxydant

Les cellules produisent naturellement divers radicaux libres (RL) par le biais notamment de la chaîne respiratoire mitochondriale. Les RL sont des molécules instables et très réactives, ayant donc une durée de vie très courte (Young and Woodside, 2001). En conditions physiologiques, il existe un équilibre entre la formation de ces RL et leur

élimination par des systèmes antioxydants endogènes tant enzymatiques (ex : superoxyde dismutase, glutathion peroxydase) que non enzymatique (ex : glutathion, vitamine E, vitamine C, mélatonine) (Chen et al., 2011).

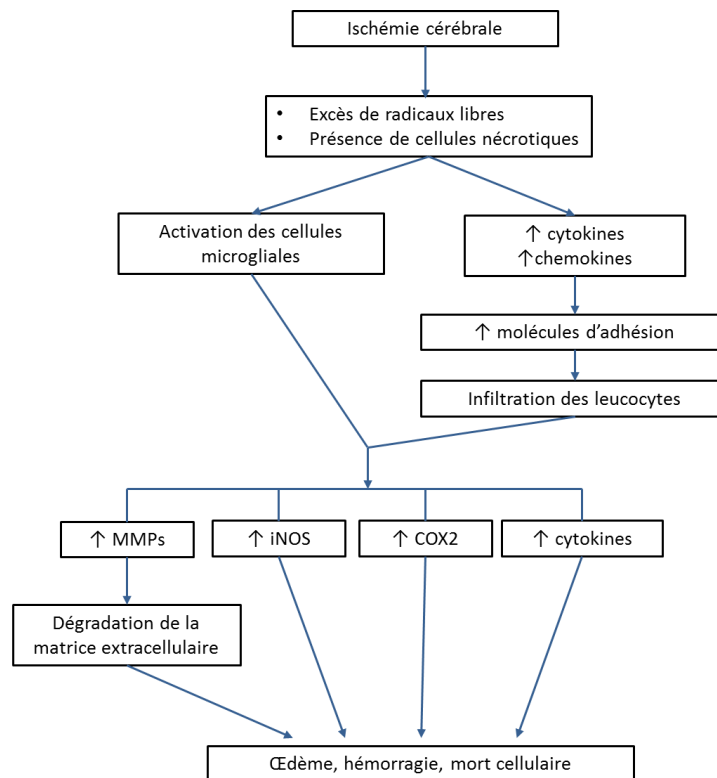
De très nombreux travaux ont montré que l'ischémie cérébrale est associée à une surproduction de RL à l'origine d'un stress oxydant participant à la mort cellulaire. On distingue les espèces réactives de l'oxygène (ROS), composées de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) pouvant se décomposer en radical hydroxyle (OH^{\bullet}), et les espèces réactives de l'azote (RNS) comme le monoxyde d'azote ($^{\bullet}NO$). En conditions ischémiques, les RL en excès entraînent une peroxydation des lipides membranaires, une oxydation des protéines et une altération de l'ADN. De plus, la combinaison des radicaux $O_2^{\bullet-}$ et $^{\bullet}NO$ aboutit à la formation de peroxynitrites ($ONOO^-$), anions particulièrement agressifs pour la cellule, provoquant des lésions de l'ADN et une oxydation protéique. La source des RL est multiple (Pradeep et al., 2012) :

- Un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale à l'origine d'une production accrue d'anions superoxydes $O_2^{\bullet-}$,
- La xanthine oxydase (XO), source importante de ROS (Papi et al., 2008),
- Les enzymes du métabolisme de l'acide arachidonique, c'est-à-dire la phospholipase A_2 (PLA_2) et les cyclo-oxygénases (COX), jouent également un rôle dans la production de l'anion superoxyde et du radical hydroxyle (Nogawa et al., 1997, Govoni et al., 2001, Dore et al., 2003),
- Les NO synthases (NOS) (Dalkara et al., 1994, Huang and Fishman, 1996, Parmentier-Batteur et al., 2001, Ding-Zhou et al., 2003),
- La NADPH oxydase, présente dans la microglie résidente et les globules blancs ayant infiltré la lésion (Cross and Segal, 2004).

e) La réponse inflammatoire

La réponse inflammatoire se caractérise sur le plan cellulaire par l'activation et la prolifération de cellules gliales et par l'infiltration de la zone lésée par les globules blancs circulants (les neutrophiles, les monocytes, puis les lymphocytes). Sur le plan biochimique, l'inflammation s'accompagne de la synthèse de médiateurs aux effets tantôt bénéfiques, tantôt délétères sur la survie cellulaire (Kobayashi, 2006, Planas et al., 2006). Ainsi, après

une ischémie cérébrale, les cellules microgliales vont être activées et vont produire des cytokines et des chemokines en grande quantité, provoquant l'expression de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales. Ces dernières se situant à l'interface entre le sang et le parenchyme cérébral vont jouer un rôle majeur dans le recrutement et l'infiltration des cellules immunitaires circulantes (Okada et al., 1994, Haring et al., 1996, del Zoppo, 2009). Les cellules endothéliales sont également une source de médiateurs de l'inflammation (cytokines, RL) (Amantea et al., 2009). Au même titre, les leucocytes infiltrés et les cellules microgliales synthétisent et sécrètent, entre autres, des métalloprotéinases matricielles (MMPs), enzymes qui dégradent la matrice extracellulaire (MEC) et donc la lame basale, la NOS inductible (iNOS), la COX2 et les ROS. De plus, l'ischémie va également être à l'origine de l'activation de certains facteurs de transcription impliqués dans la réponse inflammatoire (Wang et al., 2007a). Parmi ces facteurs, on peut citer : l'activateur de la protéine 1 (AP-1) et le facteur nucléaire κ B (NF- κ B). Ce dernier va déclencher la transcription de médiateurs de l'inflammation comme le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α), la molécule d'adhésion intracellulaire 1 (ICAM-1) ou encore l'interleukine 6 (IL-6). L'ensemble de ces mécanismes inflammatoires participe à la formation de l'œdème, au développement des hémorragies cérébrales et à la mort cellulaire (Figure 3). L'implication de ces facteurs, notamment MMPs, NF- κ B, iNOS, dans l'ouverture de la BHE post-ischémique sera développée dans la partie III-C de ce manuscrit.



MMP = métalloprotéinase matricielle ; iNOS = NO synthase inductible ; COX2 = Cyclo-Oxygénase 2

Figure 3- Processus inflammatoire post-ischémique. D'après Wang *et al.*, 2007.

f) La mort cellulaire

Les différents processus physiopathologiques de l'AVC vont aboutir à la mort cellulaire pouvant impliquer trois mécanismes : la nécrose, l'apoptose et l'autophagie.

(1) La nécrose

La nécrose est une forme de mort cellulaire non programmée qui n'apparaît qu'en réponse à une agression. Elle se caractérise par des modifications du cytoplasme qui devient éosinophile, suivis d'une condensation du noyau et d'une fragmentation aléatoire de l'ADN, aboutissant à la dégradation du noyau en de multiples fragments. La membrane plasmique est ensuite lysée, ce qui conduit au relargage du contenu intracellulaire potentialisant la réponse inflammatoire (Lipton, 1999).

(2) L'apoptose

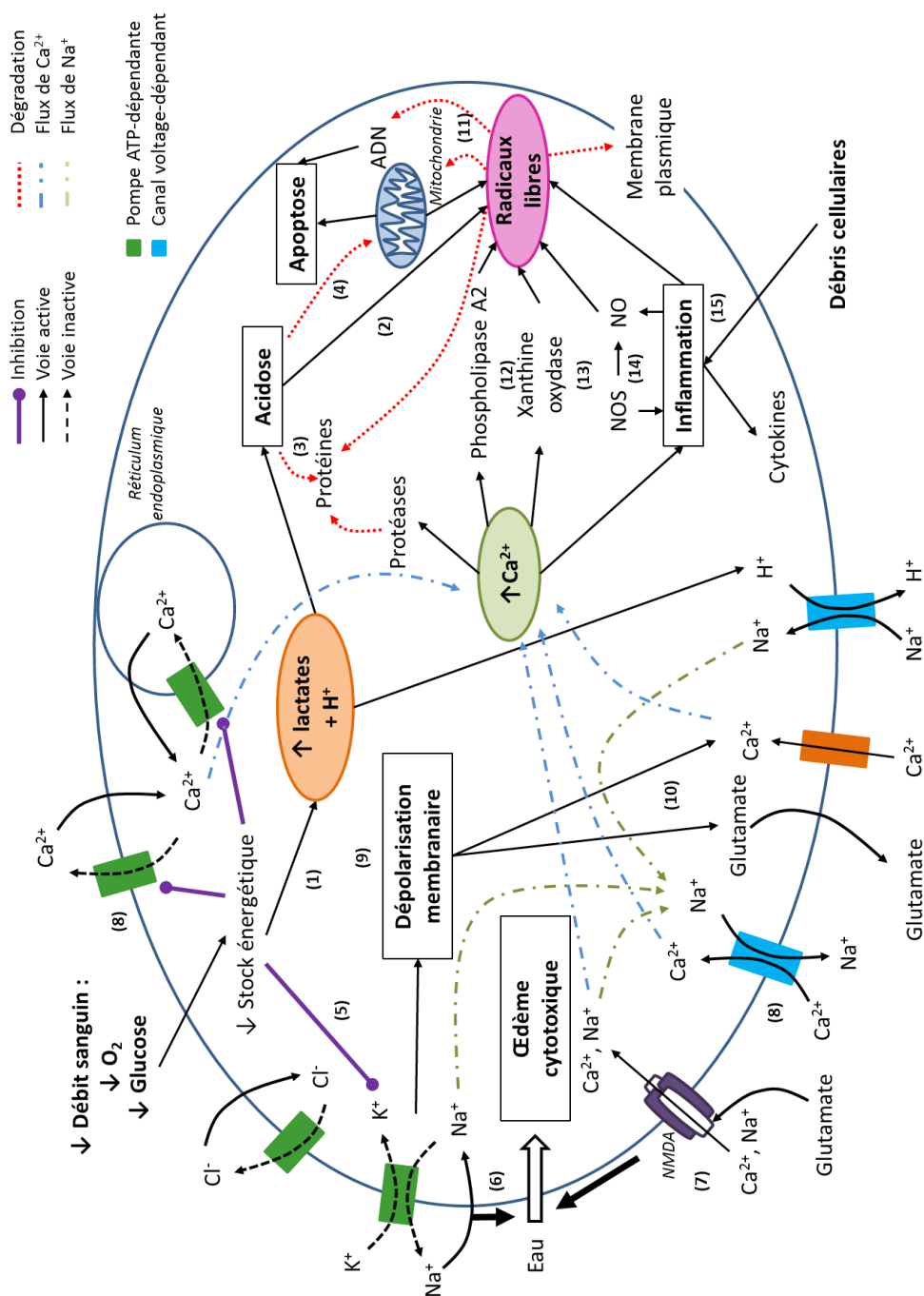
L'apoptose, contrairement à la nécrose, est un processus de mort cellulaire programmée. En conditions physiologiques, elle intervient au cours du développement, de la

différenciation et de l'homéostasie cellulaire (Alberts, 2007). Elle se caractérise par une condensation du cytoplasme, du noyau et de la chromatine, et conduit à une dégradation de l'ADN en fragments réguliers. La membrane plasmique va alors bourgeonner et former des corps apoptotiques qui seront rapidement phagocytés par les cellules voisines, ne déclenchant ainsi aucune réponse inflammatoire (Lopez-Neblina et al., 2005, Mehta et al., 2007).

(3) L'autophagie

L'autophagie est un processus d'autodigestion consistant en une dégradation des composants intracellulaires par les enzymes lysosomales localisées dans une vésicule appelée lysosome ou autophagosome. L'autophagie, comme l'apoptose, joue un rôle important en conditions physiologiques dans la croissance cellulaire, la différenciation et le maintien de l'homéostasie cellulaire. L'ischémie s'accompagne d'une dérégulation de ce mécanisme aboutissant à une digestion excessive des composants cellulaires et à la mort d'un certain nombre de neurones (Uchiyama et al., 2008, Wang et al., 2008).

Les mécanismes impliqués dans la réaction en chaîne aboutissant à la mort cellulaire d'origine ischémique sont récapitulés dans la figure 4.



- (1) Kintner et al., 2000
 (2) Oudibar et al., 1994
 (3) Petsko et al., 2004
 (4) Kristian et al., 2004
 (5) Doyle et al., 2008
 (6) Siesjö et al., 1981; Klatzo et al., 1985
 (7) Szydlowska & Tymianski, 2010
 (8) Siesjö et al., 1992
 (9) Katsura et al., 1994
 (10) Lai et al., 2014
 (11) Pradeep et al., 2012
 (12) Nogawa et al., 1997; Govoni et al., 2001; Dore et al., 2003
 (13) Papi et al., 2008
 (14) Parmentier-Batteur et al., 2001; Ding-Zhou et al., 2003
 (15) Wang et al., 2007a

Figure 4 - Schéma récapitulatif des différents mécanismes impliqués dans la réaction en chaîne aboutissant à la mort cellulaire post-ischémique.

C. Pronostic

1. Données épidémiologiques

Les AVC sont la 3^{ème} cause de mortalité après les accidents coronariens et les cancers tous types confondus, la 1^{ère} cause de handicap non-traumatique dans les pays développés, et la 2^{ème} cause de démence. Plus récemment, l'AVC a été identifié comme une cause majeure de dépression.

L'infarctus cérébral est associé à un pronostic péjoratif sur le plan vital. En effet, la mortalité à 1 mois des patients est de l'ordre de 15 à 20% (Feigin et al., 2009), de l'ordre de 20 à 30% à 6 mois (Lloyd-Jones et al., 2009), et de l'ordre de 55% à 5 ans (Bejot et al., 2009). En 2010, 16,8 millions de personnes ont été victimes d'un AVC dans le monde et 5,9 millions en sont morts. On estime que le nombre de décès annuels mondiaux liés à l'AVC atteindra 6,5 millions en 2015 et 7,8 millions en 2030 (Strong et al., 2007).

L'infarctus cérébral est aussi associé à un mauvais pronostic fonctionnel. En effet, à 6 mois, 20 à 30% des patients présentent un handicap invalidant, 20 à 25% un handicap modéré, et 15 à 40% ont complètement récupéré sur le plan moteur (Lloyd-Jones et al., 2009). Ce n'est que récemment que les troubles cognitifs secondaires à un infarctus cérébral ont commencé à être pris en considération. Une méta-analyse a révélé que 7 à 23% des patients développeront une démence dans l'année suivant un premier AVC (Pendlebury and Rothwell, 2009) et qu'environ 30% des patients présenteront une dépression (Lenzi et al., 2008).

Cependant, le pronostic des patients s'est amélioré au cours des 2 dernières décennies (Bejot et al., 2007, Feigin et al., 2009). Cette amélioration est la conséquence d'une meilleure prise en charge des patients à la phase aiguë, notamment grâce à la mise en place d'unités de soins intensifs de neurologie vasculaire, et de l'utilisation de la fibrinolyse intraveineuse par le rt-PA, seul traitement médicamenteux ayant prouvé son efficacité dans l'AVC ischémique (Hacke et al., 2008).

2. Facteurs de risques

Les facteurs de risques des AVC ischémiques peuvent être subdivisés en facteurs non modifiables et modifiables (Bejot et al., 2009, Goldstein et al., 2011).

a) Les facteurs de risques non modifiables

- L'âge est le facteur le plus important. En effet, après 55 ans, le risque d'AVC double à chaque décennie.
- Le sexe est un facteur sur lequel les données divergent. En effet, l'incidence des AVC est supérieure chez l'homme jusqu'à 85 ans, puis la tendance s'inverse. Les femmes ayant une espérance de vie supérieure, le nombre absolu d'AVC est plus important chez la femme que chez l'homme (Bejot et al., 2009, Roy-O'Reilly and McCullough, 2014).
- L'ethnie : des facteurs ethniques ont pu être identifiés, à titre d'exemple, la population africaine présente un risque d'AVC plus élevée que la population caucasienne.
- Les antécédents familiaux d'AVC pourraient multiplier le risque par deux.

b) Les facteurs de risques modifiables

- L'hypertension artérielle est le facteur de risque majeur, il multiplie le risque d'AVC par 7.
- Les pathologies cardiaques, dont la plus importante est la fibrillation auriculaire.
- D'autres facteurs comme le tabagisme, le diabète et l'hyperlipidémie sont à l'origine d'une augmentation importante du risque d'AVC.
- Bien que reconnus comme facteurs de risque, l'obésité, le régime alimentaire, la sédentarité, la consommation d'alcool, la contraception et le traitement hormonal substitutif, ont été moins bien décrits dans la littérature.

3. Facteurs pronostiques

Sauf dans de rares cas, les patients victimes d'un AVC présentent une récupération fonctionnelle spontanée plus ou moins rapide, plus ou moins importante et le plus souvent imprévisible. Bien que la récupération semble maximale dans les trois premiers mois, certains patients continuent de progresser sur le plan neurologique même au-delà d'un an. Dans ce contexte, de nombreuses études ont cherché à identifier des marqueurs précoces de pronostic. Ces derniers sont résumés dans le tableau 2.

Tableau 2 - Tableau résumant les marqueurs de mauvais pronostic clinique de l'AVC.

	Marqueurs	Conséquences	Références
Marqueurs reconnus	Déficit neurologique initial sévère (mesuré par NIHSS)	Mauvais pronostic à court, moyen et long termes.	(Patel et al., 2000, Shelton et al., 2001, Ahmed et al., 2004, Weimar et al., 2004, Nuutinen et al., 2006)
	Hyperthermie à la phase aiguë de l'AVC	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Augmentation du risque de handicap de 40 à 120 % en fonction de l'échelle utilisée. ✓ Administration d'un anti-pyrétique. 	(Greer et al., 2008, Ringleb et al., 2008, Kallmunzer et al., 2011)
	Hyperglycémie	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Mauvais pronostic à court et long termes. ✓ Résultats contradictoires chez le Rat. ✓ La prise en charge de l'hyperglycémie par l'insuline a donné des résultats décevants. 	(Marie and Bralet, 1991, Capes et al., 2001, Ringleb et al., 2008, Hyvarinen et al., 2009, Quinn and Lees, 2009)
	Age	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Vitesse et intensité de la récupération diminuent avec l'âge, pouvant être dues à une diminution des capacités plastiques du cerveau. 	(Bagg et al., 2002, Kugler et al., 2003, Calmels et al., 2005, Luk et al., 2006, Shah, 2006)
	Volume lésionnel	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Corrélié à l'état neurologique des patients à la phase aiguë de l'AVC ✓ Rôle important de la localisation de la lésion ✓ Une étude chez l'animal montre pourtant que l'administration d'un traitement diminuant de 50 % la taille de la lésion n'a pas d'impact sur le déficit neurologique 	(Schiemanck et al., 2005, Tei et al., 2006, Millerot-Serruot et al., 2007)
Marqueurs controversés	Pression artérielle (PA)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Résultats contradictoires : corrélation négative avec la récupération fonctionnelle dans certaines études, aucune corrélation dans d'autres. ✓ Pas de bénéfice à abaisser la PA à la phase aiguë de l'AVC sauf si la PA est très élevée (pression diastolique >120 mmHg et/ pression systolique >220 mmHg) 	(Robinson et al., 2001, Boreas et al., 2002, Willmot et al., 2004, Abboud et al., 2006, Jensen et al., 2006)
	Taux sanguins de protéines dérivées du cerveau	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Les taux sanguins de la « Neuron Specific Enolase » (NSE) (une protéine de localisation neuronale) sont corrélés au volume lésionnel et inversement corrélés à la récupération neurologique. ✓ La présence dans le sérum de S100β (une protéine astrocytaire) observée au 3^{ème} jour post-AVC est corrélée au volume lésionnel et au risque de transformation hémorragique. 	(Anand and Stead, 2005, Dassan et al., 2009)
	Protéines de l'inflammation	Une augmentation des taux circulants de protéine C réactive, en IL-6 ou en fibrinogène, serait associée à un mauvais pronostic fonctionnel.	(Di Napoli et al., 2005, Whiteley et al., 2009)

Il est important de souligner que les patients présentant des antécédents d'accidents ischémiques transitoires (AIT) ont un meilleur pronostic vital et fonctionnel après AVC (Aboa-Eboule et al., 2011, Bejot et al., 2011a). Il a été suggéré que l'AIT augmenterait la résistance neuronale à un événement ischémique ultérieur selon des mécanismes de préconditionnement ischémique bien identifiés chez l'animal (Dirnagl et al., 2009).

D. Diagnostic et Prise en charge

1. Diagnostic

La suspicion d'un AVC se base sur la perte brutale et spontanée d'une fonction cérébrale focale ou globale sans autres causes apparentes qu'une cause vasculaire.

La nature des symptômes présentés par le patient dépend de la localisation de la lésion. (HAS, Argumentaire 2009 : www.has-santé.fr) (Figure 5):

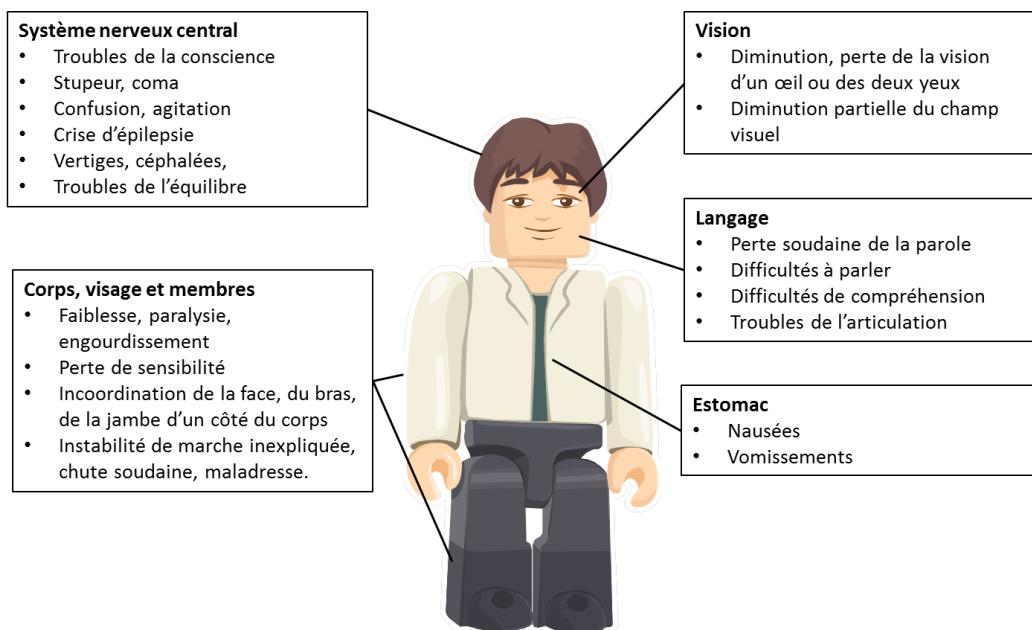


Figure 5- Symptômes cliniques des AVC ischémiques.

2. Prise en charge

Le diagnostic doit être le plus précoce possible afin de permettre la mise en place d'un traitement approprié et ainsi de limiter les séquelles. En premier lieu, il est donc nécessaire de différencier le caractère ischémique ou hémorragique de l'AVC à la phase aiguë grâce à l'imagerie. Les deux techniques d'imagerie cérébrale utilisées sont le scanner

et l'imagerie par résonnance magnétique (IRM). Le scanner, méthode la plus utilisée, permet uniquement de conclure sur la présence ou non d'une hémorragie, tandis que l'IRM, plus performante, permet la détection précoce de l'ischémie (<1 heure).

La sévérité de l'AVC est évaluée par l'examen clinique et notamment par le score NIHSS (Tableau 3). Ce score, réalisé à l'admission du patient, sert à la prise de décision concernant la mise en place d'une fibrinolyse par rt-PA, et permet de suivre l'évolution du déficit neurologique du patient.

Tableau 3 - Résumé de l'échelle NIHSS.

Items compris dans l'échelle NIHSS	Score	Commentaires
Niveau de conscience	0-3	- Le score total se situe entre 0 et 42
Questions concernant l'âge du patient et l'année en cours	0-2	
Commandes : ouvrir et fermer les yeux, serrer et relâcher la main non parétique	0-2	
Oculomotricité	0-2	
Vision	0-3	
Paralysie faciale	0-3	- Un score de 0 à 1 est considéré comme un bon état clinique
Motricité du membre supérieur gauche	0-4	
Motricité du membre supérieur droit	0-4	
Motricité du membre inférieur gauche	0-4	
Motricité du membre inférieur droit	0-4	
Ataxie des membres	0-2	- Les scores supérieurs à 5 reflètent un déficit neurologique léger
Sensibilité	0-2	
Langage	0-3	
Dysarthrie	0-2	
Extinction et négligence	0-2	
		- Les scores supérieurs à 25 correspondent à un déficit majeur

La prise en charge d'un AVC ischémique s'articule autour de 5 points (Mahagne, 2007):

- Les mesures générales de prise en charge du patient dès l'admission incluant le suivi de la température, de la pression artérielle, de la glycémie, de la saturation en oxygène et de l'électrocardiogramme.
- La fibrinolyse par le rt-PA qui doit être réalisée dans les 4h30 qui suivent l'apparition des premiers symptômes.

- La prévention et le traitement des complications neurologiques (œdème cérébral, hypertension intracrânienne, épilepsie, dépression) ainsi que des complications générales (thrombose veineuse profonde, embolie pulmonaire, pneumonie, infection urinaire, escarres) font partie intégrante de cette prise en charge.
- La rééducation précoce par kinésithérapie, ergothérapie et orthophonie est désormais reconnue comme bénéfique.
- Enfin, la mise en place rapide de stratégies de prévention des récives qui ont pour objectif d'éviter la survenue de nouveaux événements thrombotiques. Les stratégies pharmacologiques font appel aux antiagrégants plaquettaires dans le cas d'une origine athéromateuse de l'AVC, aux anticoagulants dans le cas d'une origine cardioembolique, et à la correction des facteurs de risques modifiables (hypertension artérielle, hypercholestérolémie, diabète, tabagisme...). Il est à noter que les statines sont désormais utilisées quasi systématiquement en prévention secondaire, même si le patient ne présente pas de troubles lipidiques.

E. Plasticité et récupération fonctionnelle

Comme évoqué précédemment (I-C-3), la majorité des patients présente une amélioration fonctionnelle spontanée à la suite d'un AVC. Cette récupération neurologique serait la conséquence, outre la résorption de l'œdème vasogénique, de la mise en place de processus de plasticité post-lésionnelle. La stimulation de la neuroplasticité post-lésionnelle est à l'heure actuelle considérée comme une cible thérapeutique incontournable de l'AVC. Plus précoce est cette stimulation, plus rapide et meilleure est la récupération neurologique (Jorgensen et al., 1995, Paolucci et al., 2000). Différentes stratégies pourront être mis en place, dont : l'activité physique, la stimulation magnétique transcrânienne (SMT), et les thérapies pharmacologiques.

1. L'activité physique

A l'heure actuelle, la majorité des patients victimes d'un AVC et présentant un déficit moteur bénéficient de protocoles de rééducation motrice dont l'efficacité est connue depuis plusieurs décennies (Ottenbacher and Jannell, 1993). Chez l'animal, les études concernant

les effets de l'activité physique après un AVC rapportent une diminution du déficit neurologique chez les animaux exercés par rapport aux animaux sédentaires. Ainsi, certains auteurs, mais pas tous (Griesbach et al., 2004, Kim et al., 2005), montrent que les bénéfices de l'activité physique sont d'autant plus importants qu'elle est débutée de façon précoce (Yang et al., 2003). Chez l'Homme, toutefois, il n'existe actuellement aucune recommandation sur le choix des techniques rééducatives à utiliser, les recommandations actuelles de la Haute Autorité de Santé (HAS) portant uniquement sur la précocité, l'intensité et la continuité de la rééducation (2012). Le point le plus clairement identifié est que les protocoles d'activité physique doivent être instaurés le plus précocement possible, soulignant l'existence d'une période post-AVC durant laquelle le cerveau serait plus réceptif (Horn et al., 2005, Salter et al., 2006, Murphy and Corbett, 2009). Cependant, des données récentes ont montré l'effet bénéfique d'une rééducation même tardive (Cauraugh et al., 2011).

2. La stimulation magnétique transcrânienne

La SMT est susceptible de modifier durablement l'excitabilité corticale cérébrale. L'effet obtenu dépend de la fréquence de stimulation utilisée : une stimulation haute fréquence (> 5 Hz) augmente l'excitabilité corticale alors qu'une stimulation basse fréquence (< 1 Hz) la diminue (Hallett, 2007). Deux approches thérapeutiques ont ainsi été développées chez les patients victimes d'un AVC. La première consiste à augmenter l'excitabilité corticale de l'hémisphère lésé (Khedr et al., 2005) et la seconde à réduire l'excitabilité corticale de l'hémisphère contralatéral à la lésion (Mansur et al., 2005, Takeuchi et al., 2005, Fregni et al., 2006). L'amélioration fonctionnelle induite par la SMT peut se maintenir chez les patients pendant un an (Khedr et al., 2005, Mansur et al., 2005, Takeuchi et al., 2005, Fregni et al., 2006, Khedr and Fetoh, 2010). Dans la recherche des mécanismes impliqués dans ce phénomène, l'implication du brain-derived neurotrophic factor (BDNF) a été suggérée (voir chapitre II)(Cheeran et al., 2008).

3. La thérapie médicamenteuse

L'idée de développer des thérapies médicamenteuses ciblant la neuroplasticité naît au début des années 80 lorsque Feeney *et al.* (1982) mettent en évidence chez la Souris soumise à une ischémie cérébrale un effet positif de l'amphétamine sur la récupération

neurologique post-lésionnelle. L'amphétamine induit une augmentation de la libération de sérotonine, noradrénaline et dopamine. Or, Feeney et son équipe montrent que les effets bénéfiques de l'amphétamine sont annulés par l'halopéridol, un neuroleptique antipsychotique, antagoniste des récepteurs dopaminergiques. De plus, lorsqu'il est administré seul, l'halopéridol réduit la récupération motrice des rats, suggérant que l'action bénéfique de l'amphétamine est dépendante de l'augmentation de la neurotransmission dopaminergique. Plus tard, l'effet bénéfique de l'amphétamine a été relié à la repousse axonale et à la synaptogenèse dans le cortex ipsilatéral et contralatéral à la lésion (Stroemer et al., 1998, Papadopoulos et al., 2009). Ces résultats encourageants chez l'animal ont conduit à tester cette molécule chez l'Homme, aboutissant à des résultats ambivalents jusqu'à une méta-analyse de 2007, incluant 226 malades, qui a montré que les performances motrices ne sont pas différentes entre patients traités par amphétamine ou par placebo (Martinsson et al., 2007), clôturant ainsi le débat sur l'utilisation des amphétamines en cas d'AVC.

Dans ce contexte, l'intérêt de la communauté scientifique s'est alors tourné vers la neurotransmission sérotoninergique (Liepert, 2008). Ainsi, il a été montré que l'administration d'inhibiteurs de la recapture de la sérotonine (IRSS) comme la fluoxétine ou le citalopram est associée à une meilleure récupération fonctionnelle (Dam et al., 1996, Pariente et al., 2001, Zittel et al., 2008, Acler et al., 2009, Chollet et al., 2011). Si les mécanismes d'action restent à l'heure actuelle inconnus, certaines études chez l'animal suggèrent, là encore, l'implication du BDNF (Russo-Neustadt et al., 1999, Coppel et al., 2003), tandis qu'une étude récente évoque un rôle protecteur de la fluoxétine vis-à-vis de la rupture de la BHE post-AVC (Lee et al., 2014).

II. LE BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR

Comme évoqué précédemment, les différentes stratégies visant à stimuler la neuroplasticité post-AVC semblent désigner le BDNF comme dénominateur commun.

Le BDNF appartient à la famille des neurotrophines qui comprend le nerve growth factor (NGF) et les neurotrophines 3 (NT3) et 4 (NT4). Le BDNF a été isolé pour la première fois en 1982 par l'équipe de Barde (Barde et al., 1982) à partir de cerveaux porcins.

Le gène *bdnf* a été cartographié sur le chromosome 11 chez l'Homme, sur le chromosome 2 chez la Souris et le chromosome 3 chez le Rat (Ozcelik et al., 1991). Les souris génétiquement modifiées dont les deux allèles du gène *bdnf* sont inactivées (BDNF^{-/-}) ne sont pas viables. De manière intéressante, les souris hétérozygotes (BDNF^{+/-}) sont viables mais présentent une hyperphagie et donc une obésité.

Comme tous les peptides, le BDNF est synthétisé sous forme d'un précurseur de haute masse moléculaire, le pré-proBDNF, qui sera ensuite clivé en proBDNF puis en BDNFmature (BDNFm) grâce à différentes enzymes (Figure 6).

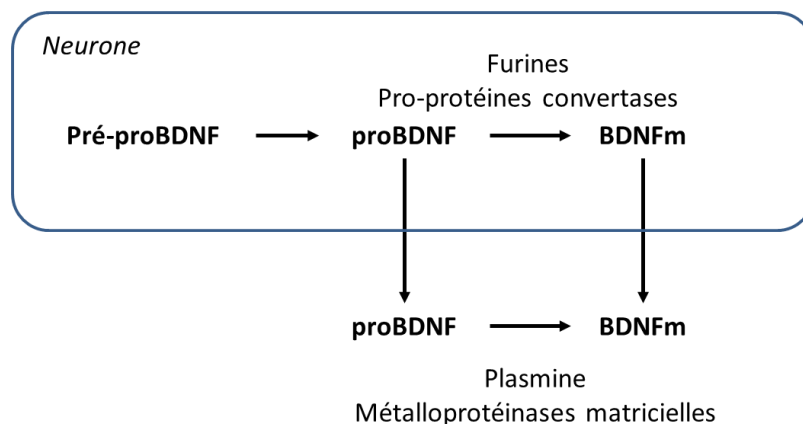


Figure 6 - Métabolisme du BDNF d'origine neuronal.

A. BDNF tissulaire

1. Répartition et localisation cellulaire du BDNF dans l'organisme

Les premières études portant sur la localisation cellulaire du BDNF au sein du SNC ont été menées au début des années 1990. Dans ces études, il a été montré par technique histochimique que l'expression des messagers codant le BDNF est confinée aux neurones, avec des niveaux d'expression élevés au niveau du cerveau, du cervelet, du tronc cérébral et de la moelle épinière. Dans le cerveau, le cortex et surtout l'hippocampe sont les régions

présentant les expressions d'ARNm les plus élevées (Ernfors et al., 1990, Hofer et al., 1990, Wetmore et al., 1990). A la fin des années 90 apparaissent les premiers anticorps dirigés contre le BDNF. Ils représentent une véritable avancée car ils permettent de visualiser la protéine BDNF à l'étage cellulaire et d'en évaluer les taux tissulaires (Kawamoto et al., 1996). De plus, si pendant longtemps les neurones ont été considérés comme la principale source de BDNF au niveau cérébral, on sait désormais que les cellules endothéliales, les épendymocytes, les astrocytes et la microglie sont capables de le synthétiser (Madinier et al., 2009, Bejot et al., 2011c).

En dépit de son appellation, le BDNF n'est pas présent uniquement au niveau central, mais peut être retrouvé au niveau périphérique. Cependant, la littérature est assez pauvre en ce qui concerne les taux de BDNF dans les organes périphériques. Le BDNF a néanmoins été retrouvé au niveau du cœur, des vaisseaux pulmonaires et des poumons, des muscles squelettiques, du thymus, de la rate, de la peau, de la muqueuse nasale, de la rétine et des glandes submandibulaires (Timmusk et al., 1993, Laurenzi et al., 1994, Griesbeck et al., 1995, Perez and Caminos, 1995, Yamamoto et al., 1996, Ricci et al., 2000, Ricci et al., 2004, Rochlitzer et al., 2006, Tsukinoki et al., 2006, Caporali and Emanuelli, 2009, Prakash et al., 2010). Récemment, notre laboratoire a montré que le cœur et l'aorte contiennent autant de BDNF que l'hippocampe (Prigent-Tessier et al., 2013).

2. Le gène *bdnf*

Au début des années 90, quatre transcrits de *bdnf* ont été identifiés chez le Rat (Metsis et al., 1993, Timmusk et al., 1993, Timmusk et al., 1995), chacun conduisant à la transcription d'ARNm contenant un des quatre exons 5' non codants couplé à l'exon 3' commun codant la protéine. Cependant, en 2007, l'équipe d'Aid montre chez le Rat que le gène est constitué d'au moins huit exons 5' non traduits (notés I à VIII) associés à l'exon 3' commun codant BDNF. Ainsi, chaque transcrit possède un exon 5' lié à un exon 3'.

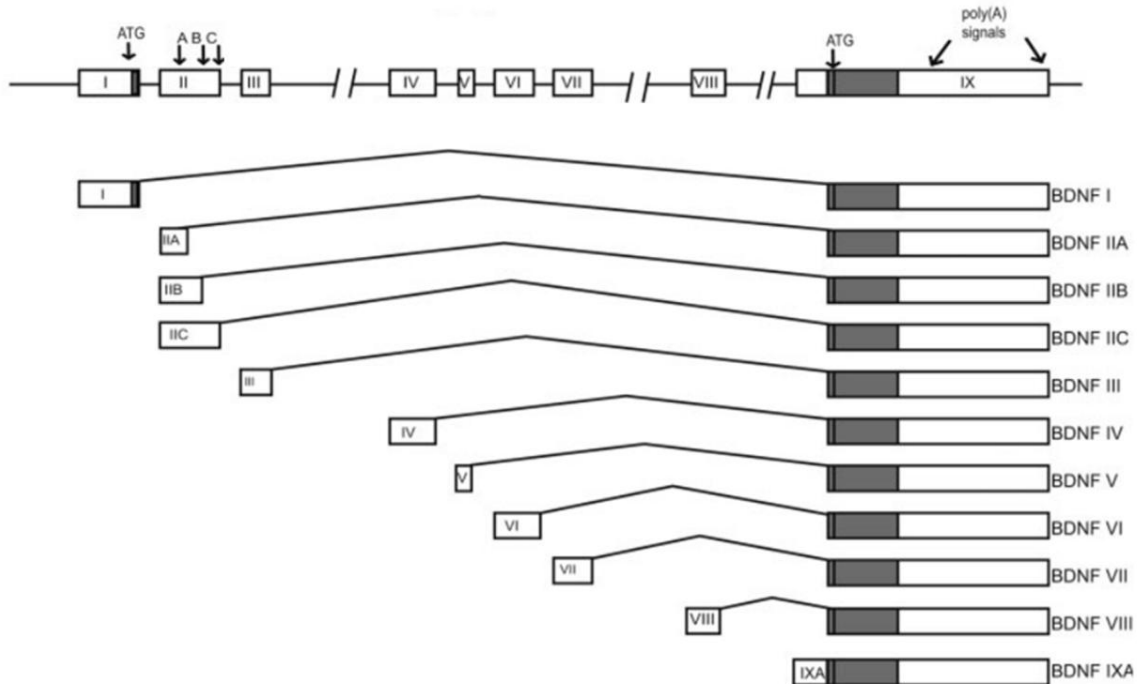


Figure 7 - les différents transcrits du gène *bdnf* chez le Rat. D'après Aid *et al.*

Structure du gène décrite par Aid *et al.*. Les introns sont représentés par des lignes horizontales, les régions codant la protéine par des boîtes grisées et les régions transcrites mais non traduites par des boîtes blanches. Chacun des exons 5' non traduits est associé à l'exon 3' commun IX codant la protéine BDNF. Concernant l'exon II, trois différents variants de transcription (IIA, IIB, IIC) sont générés à l'issue de l'épissage alternatif de cet exon (flèches marquées A, B, C).

Chez la Souris et le Rat, les exons III, V, VII, VIII et IXA sont exprimés de manière différentielle dans le cerveau et dans les tissus périphériques (Aid *et al.*, 2007). L'expression du gène *bdnf* est régulée par l'activité neuronale (Shieh and Ghosh, 1999, West *et al.*, 2001, Mellstrom *et al.*, 2004). Plusieurs éléments sensibles au calcium ont été identifiés dans les régions promotrices en amont de ces exons (Timmusk *et al.*, 1999, Tabuchi *et al.*, 2002, Tao *et al.*, 2002). L'expression du gène *bdnf* est sous le contrôle de différents facteurs de transcription, notamment « cAMP responsive element binding protein » (CREB), « calcium-responsive transcription factor » (CaRF) et « upstream stimulatory factor » (USF) (Tao *et al.*, 2002, Dias *et al.*, 2003, Pruunsild *et al.*, 2011). En outre, il existe une régulation différentielle de l'expression du gène *bdnf* par la méthylation de l'ADN et l'acétylation des histones (Aid *et al.*, 2007). L'ensemble de ces éléments suggère une régulation très complexe de l'expression du gène *bdnf*.

Chez l'Homme, le gène codant le BDNF est le siège d'un polymorphisme fonctionnel affectant un nucléotide au sein du codon 66. Ce polymorphisme aboutit au remplacement

de la Valine (Val) par une Méthionine (Met). Au sein de la population caucasienne, on estime que 20 à 30 % des individus sont hétérozygote Val/Met et 4% sont homozygotes Met/Met.

3. Maturation et sécrétion du BDNF

Comme évoqué en introduction de ce chapitre, le BDNF est un peptide homodimérique synthétisé sous forme d'un précurseur de haute masse moléculaire, le pré-proBDNF qui va être successivement clivé en proBDNF (35 kDa) puis en BDNF mature (BDNFm) (14kDa).

Après maturation, l'ARNm codant le BDNF est traduit au niveau du réticulum endoplasmique rugueux en pré-proBDNF. Ce dernier est constitué d'une séquence signal de 18 acides aminés (aa), d'un pro-domaine de 110 aa chez le rongeur et 112 aa chez l'Homme, et d'une séquence mature de 119 aa (Figure 8).

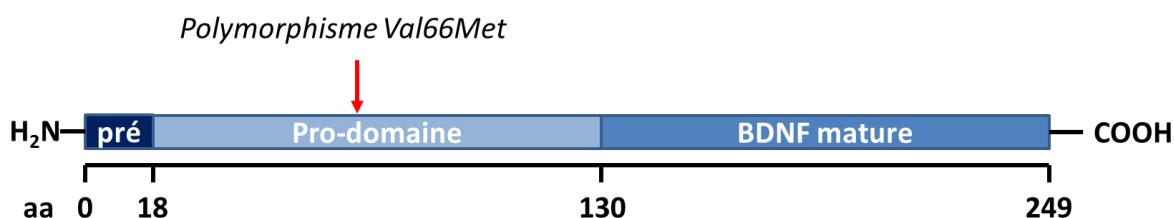


Figure 8 - Représentation schématique des différents domaines de la protéine BDNF.

Le pré-proBDNF est ensuite clivé en pro-BDNF après son passage dans le réticulum endoplasmique lisse. Le proBDNF peut alors s'accumuler dans les vésicules du réseau trans-golgien (RTG) et peut (ou non) être clivé en BDNFm par la furine (une endoprotéase membranaire). Il sera ensuite stocké dans les vésicules trans-golgiennes avant d'être libéré dans l'espace extracellulaire de manière constitutive (permanente mais non régulée). Le proBDNF peut également quitter le RTG pour les granules de sécrétion où son clivage protéolytique pourra être assuré par les pro-protéines convertases PC 1/7. Les granules vont alors s'accumuler au niveau des dendrites et des terminaisons axonales et vont sécréter le BDNFm en réponse à un signal calcique. Il s'agit de la voie de sécrétion régulée, voie prépondérante de sécrétion du BDNFm par le neurone (Figure 9) (Mowla et al., 2001, Lessmann et al., 2003, Brigadski et al., 2005, Greenberg et al., 2009, Lessmann and Brigadski, 2009). Enfin, le proBDNF peut être pris en charge au niveau intracellulaire par une protéine chaperonne, la sortiline, qui va permettre son transport par la voie de sécrétion régulée

(Patterson et al., 1996, Akaneya et al., 1997, Carter et al., 2002, Pang et al., 2004, Chen et al., 2005b, Evans et al., 2011).

Des études réalisées *in vivo* et *in vitro* s'accordent à montrer que le glutamate augmente la synthèse et la sécrétion du BDNF, tandis que le GABA (neurotransmetteur inhibiteur) l'inhibe (Zafra et al., 1990, Zafra et al., 1991). D'autres neuromédiateurs comme l'acétylcholine (Lindefors et al., 1992), la dopamine (Kuppers and Beyer, 2001) et la sérotonine (Vaidya et al., 1997) sont également capables d'accroître les taux d'ARNm codant le BDNF. En effet, plus l'activité neuronale s'accroît, plus la concentration cytosolique en calcium est importante et plus la sécrétion régulée est augmentée. Par ailleurs, l'activité neuronale régule le transport des ARNm du BDNF et de la protéine vers les dendrites (Tongiorgi, 2008). La synthèse du BDNF est également sensible aux hormones stéroïdiennes (les oestrogènes, la progestérone, la testostérone ou encore les glucocorticoïdes) qu'elles soient circulantes ou produites localement (Tapia-Arancibia et al., 2004, Begliuomini et al., 2008).

Des données datant du milieu des années 2000 suggèrent que les neurones peuvent également sécréter le proBDNF (Lu et al., 2005), mais ces résultats ne font pas l'unanimité dans la communauté scientifique (Matsumoto et al., 2008, Barker, 2009). Une fois dans l'espace extracellulaire, le proBDNF serait transformé en BDNFm par les métalloprotéinases matricielles MMP3 et MMP7, mais également par la plasmine (Lee et al., 2001, Pang et al., 2004). L'ensemble de ces mécanismes est représenté dans la figure 9.

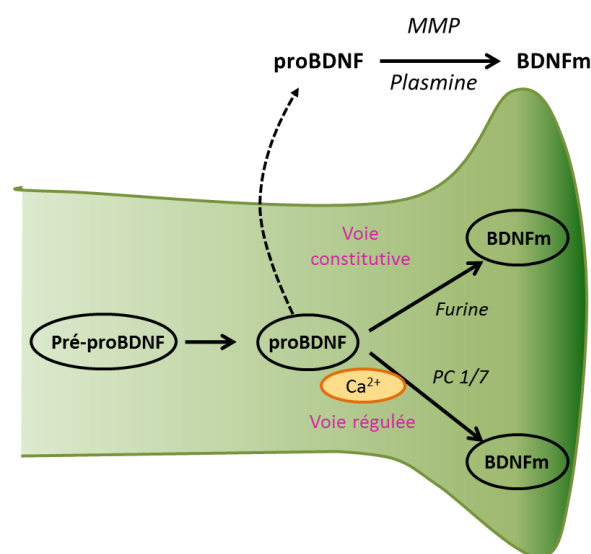


Figure 9 - Métabolisme neuronal du BDNF, et les différents mécanismes cellulaires pouvant être impliqués dans le clivage du proBDNF en BDNFm.

Concernant le polymorphisme Val66Met, celui-ci est localisé dans la séquence codant le proBDNF. Il n'est pas associé à une modification des taux de proBDNF et BDNFm mais semble perturber la distribution cellulaire et le transport du BDNF par les vésicules de sécrétion ce qui va conduire à une diminution de la sécrétion régulée du BDNFm (Egan et al., 2003, Chen et al., 2004, Chen et al., 2005b, Chen et al., 2008).

De manière intéressante, les techniques conventionnelles telles que les tests ELISA ou l'immunohistologie ont pendant longtemps utilisé des anticorps ne différenciant pas les deux formes du BDNF (proBDNF et BDNFm). Néanmoins, il a récemment été montré que certains kits ELISA reconnaissaient majoritairement [ChemiKine™, Laboratoires Millipore] voire spécifiquement [HUMAN BDNF ELISA kit SK00752-01, Laboratoires AvisceraBiosciences] le BDNFm. De plus, ce n'est que récemment que la technique de Western blotting utilisant des anticorps spécifiques a permis l'étude semi-quantitative de l'expression du proBDNF et du BDNFm (Quirie et al., 2012).

B. BDNF circulant

Le BDNF est présent dans le sang. Alors que le rôle du BDNF sanguin est encore inconnu, les taux de BDNF sériques faibles semblent associés à un risque accru d'AVC et/ou d'AIT (Pikula et al., 2013), tandis que des taux sériques élevés de BDNF protégeraient contre le développement de démence et de maladie d'Alzheimer (Weinstein et al., 2014). Ainsi, le BDNF circulant pourrait avoir des effets neuro- et vasculoprotecteurs. De plus, certains travaux expérimentaux suggèrent que les taux sanguins de BDNF pourraient être un reflet des taux cérébraux (Dwivedi, 2013, Munkholm et al., 2014).

1. Origine cellulaire du BDNF circulant

Dans le sang, le BDNF est essentiellement présent dans les plaquettes et va pouvoir être sécrété au cours du processus de coagulation (Fujimura et al., 2002) expliquant pourquoi les taux sériques de BDNF sont 100 à 200 fois supérieurs aux taux plasmatiques (Rosenfeld et al., 1995). Etant dépourvues de noyau, les plaquettes sont incapables de synthétiser le BDNF mais sont capables de capter par un mécanisme non élucidé celui présent dans le plasma. Le point qui reste à éclaircir est l'origine cellulaire du BDNF présent dans le plasma. Trois origines possibles font à l'heure actuelle l'objet d'un débat : le

neurone, la cellule endothéliale et les autres types cellulaires, notamment les globules blancs.

a) Le neurone

Le cerveau et la moelle épinière étant riches en BDNF, le BDNF plasmatique pourrait provenir du SNC. Cela impliquerait donc que le BDNF présent dans le liquide interstitiel cérébral puisse atteindre le sang jugulaire en traversant la BHE ou en passant dans le LCR, ce qui reste à démontrer. En effet, peu d'études se sont penchées sur le passage du BDNF à travers la BHE et leurs résultats sont contradictoires (Pardridge et al., 1994, Pan et al., 1998, Ochs et al., 2000). L'existence d'une association entre taux cérébraux et circulants de BDNF est souvent pris comme argument en faveur d'une origine neuronale du BDNF circulant. Néanmoins, si cette corrélation a en effet été montrée au cours du développement post-natal chez le Rat (Karege et al., 2002, Sartorius et al., 2009), elle n'a pas été retrouvée chez l'animal adulte (Mannari et al., 2008, Elfving et al., 2010, Bejot et al., 2011b). L'étude de Rasmussen (2009) est souvent citée pour soutenir l'hypothèse d'une origine neuronale du BDNF circulant. En effet, les auteurs montrent que la concentration en BDNF est plus élevée dans le sang prélevé dans la veine jugulaire que celui prélevé dans l'artère radiale aussi bien au repos qu'après la réalisation d'un exercice physique. Cependant, l'étude de Rasmussen ne caractérise pas l'origine cellulaire de la neurotrophine, qui peut être aussi bien le neurone que la cellule endothéliale tapissant la paroi vasculaire.

b) La cellule endothéliale

Les cellules endothéliales en culture, qu'elles soient périphériques ou centrales, expriment le BDNF (Nakahashi et al., 2000, Quirie et al., 2012). Récemment, le laboratoire a montré que l'aorte et les artérioles intracérébrales expriment *in vivo* le BDNF, avec une expression très marquée au niveau de l'endothélium (Prigent-Tessier et al., 2013). Par ailleurs, les pathologies s'accompagnant d'une dysfonction endothéliale comme l'hypertension (Ghiadoni et al., 2012) ou encore le diabète de type 2 (Krabbe et al., 2007) sont associées à une diminution des taux circulants de BDNF. Ainsi, ces données ne remettent pas en question l'hypothèse de Rasmussen sur l'origine cérébrale du BDNF circulant, mais suggèrent que la source de ce BDNF pourrait être la cellule endothéliale et

non le neurone. Actuellement, aucune preuve irréfutable n'a cependant été fournie permettant de conclure que le BDNF présent dans le sang est d'origine endothéliale.

c) Les autres types cellulaires

D'autres types cellulaires sont capables de synthétiser le BDNF dans certaines conditions et constituent à ce titre une source potentielle du BDNF présent dans le plasma. Parmi ces cellules, on peut citer les globules blancs circulants (lymphocytes et monocytes), les cellules musculaires squelettiques, les cellules endocriniennes et les cellules endométriales (Esteban et al., 1995, Nemoto et al., 1998, Kerschensteiner et al., 1999, Nakahashi et al., 2000, Krizsan-Agbas et al., 2003, Enstrom, 2008, Matthews et al., 2009).

2. Déterminants du BDNF circulant

Différents facteurs sont capables de modifier les taux circulants de BDNF (Bus et al., 2011) : l'âge, le cycle nycthéral, le cycle menstruel, l'activité physique, les conditions de vie, la santé cardiovasculaire et métabolique et la dépression. Les effets de ces facteurs sont détaillés dans le tableau 4.

Tableau 4 - Récapitulatif de l'ensemble des facteurs déterminants des taux de BDNF circulants.

Facteur déterminant	Effets	Référence
L'âge	<ul style="list-style-type: none"> ✓ ↓ des taux de BDNF plasmatiques et sériques chez la personne âgée. ✓ Corrélation positive entre la taille de l'hippocampe et les taux de BDNF. 	(Lommatzsch et al., 2005, Erickson et al., 2010)
Le cycle nycthéméral	Corrélation des taux plasmatiques de BDNF avec les taux circulants de cortisol.	(Begliuomini et al., 2008)
Le cycle menstruel	<ul style="list-style-type: none"> ✓ ↑ des taux plasmatiques de BDNF pendant la phase pré-ovulatoire. ✓ ↓ des taux plasmatiques de BDNF à la ménopause. ✓ Corrélation positive avec les taux d'œstradiol. ✓ Corrélation négative avec les taux de progestérone. 	(Begliuomini et al., 2007)
L'activité physique (AP)	↑ taux circulants de BDNF lors de l'AP, avec une normalisation rapide après l'arrêt	(Gold et al., 2003, Ferris et al., 2007, Rasmussen et al., 2009, Griffin et al., 2011)
Les conditions de vie	↓ des taux de BDNF sériques chez les fumeurs et les citadins.	(Bus et al., 2011)
La santé cardiovasculaire et métabolique	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Corrélation positive entre les taux plasmatiques de BDNF et la pression artérielle diastolique. ✓ Corrélation positive entre les taux de BDNF et l'indice de masse corporelle ainsi que les taux de cholestérol chez la femme. ✓ Corrélation positive entre les taux de BDNF et les triglycérides chez l'homme. 	(Golden et al., 2010)
La dépression	<ul style="list-style-type: none"> ✓ ↓ des taux de BDNF sériques chez les patients dépressifs. ✓ Normalisation des taux de BDNF au cours d'un traitement adapté par antidépresseur. 	(Autry and Monteggia, 2012)

Aussi, la forte variabilité interindividuelle des taux circulants de BDNF rapportée dans la littérature pourrait s'expliquer par la multiplicité des facteurs capables de modifier ces taux.

C. Mécanismes d'action et rôles du BDNF dans l'organisme

1. Les récepteurs du BDNF

Le BDNF agit *via* l'activation de récepteurs membranaires : les récepteurs TrkB (Tropomyosin related kinase B) présentant une forte affinité pour le BDNFm et les récepteurs p75^{NRT} (pan 75 neurotrophin receptor) qui possèdent une forte affinité pour le proBDNF (Teng et al., 2005). Si le récepteur TrkB est spécifique du BDNF, le récepteur p75^{NRT} est quant à lui activé par toutes les pro-neurotrophines. En ce qui concerne le pro-domaine

de la protéine (Figure 10), celui-ci a la capacité de se fixer à la sortiline, qui va agir comme un co-récepteur de p75^{NRT}.

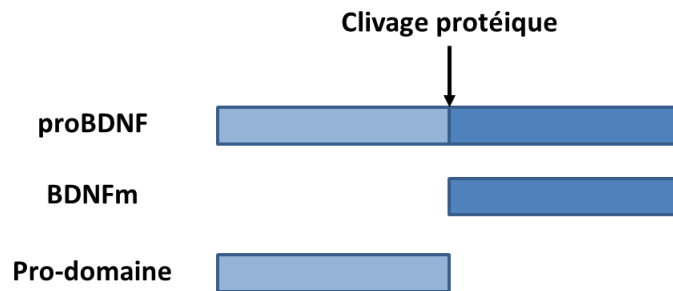


Figure 10 - Schéma représentatif du clivage du proBDNF donnant lieu à la libération du BDNFm et du pro-domaine.

a) *TrkB*

Le récepteur TrkB est une protéine transmembranaire hautement glycosylée appartenant à la superfamille des récepteurs à activité tyrosine kinase et à la famille des récepteurs Trk_s (Tropomyosin related kinase) constitué de trois membres TrkA, TrkB, TrkC. Le récepteur TrkB est composé de trois régions différentes (Reichardt, 2006, Skaper, 2008). La région extracellulaire du récepteur consiste en deux domaines riches en cystéines entre lesquels s'intercalent trois domaines riches en leucine suivis de deux domaines de types immunoglobulines. Il constitue la région d'interaction avec le BDNFm. Le récepteur n'est composé que d'une seule région transmembranaire et se termine par une région cytoplasmique comprenant un site de fixation de la protéine adaptatrice Shc, une région tyrosine kinase entourée par plusieurs tyrosines qui formeront le site de phosphorylation nécessaire à l'activation de la cascade de signalisation, et une partie terminale contenant le site de fixation de la phospholipase C-gamma (PLC-γ). Il est important de noter que le récepteur présente trois isoformes. Une forme entière TrkB-FL (TrkB-Full Length) et deux formes tronquées à l'extrémité C-terminale, TrkB-T1 et TrkB-T2.

La fixation du BDNFm (homodimère) sur le récepteur TrkB-FL va induire la dimérisation et l'autophosphorylation des résidus tyrosine du domaine cytoplasmique du récepteur. Ce phénomène va être à l'origine du recrutement de protéines adaptatrices aboutissant à l'activation de trois voies de signalisation majeures : la voie des PI3-kinases (PI3-kinase/Akt), la voie de la phospholipase C gamma 1 (PLC-γ1) et la voie des MAP kinases (Ras/Raf/MAPK) (McCarthy et al., 2012). La voie des PI3-kinase conduit à l'activation de la sérine/thréonine kinase Akt, enzyme jouant un rôle majeur dans la régulation de la

transcription des gènes impliqués dans la croissance neuronale et la survie cellulaire, en inhibant l'activation des gènes pro-apoptotiques. La voie de la PLC- γ 1 est également mise en jeu dans des mécanismes de survie cellulaire, mais aussi dans la plasticité synaptique et la neurotransmission. Pour finir, la voie des MAP kinases déclenche l'activation et la translocation du facteur de transcription CREB. Ce facteur est responsable de la transcription de gènes essentiels à la prolifération et la survie des cellules, la différenciation des neurones, et la formation des neurites (Reichardt, 2006). L'ensemble de ces mécanismes est représenté schématiquement dans la figure 11.

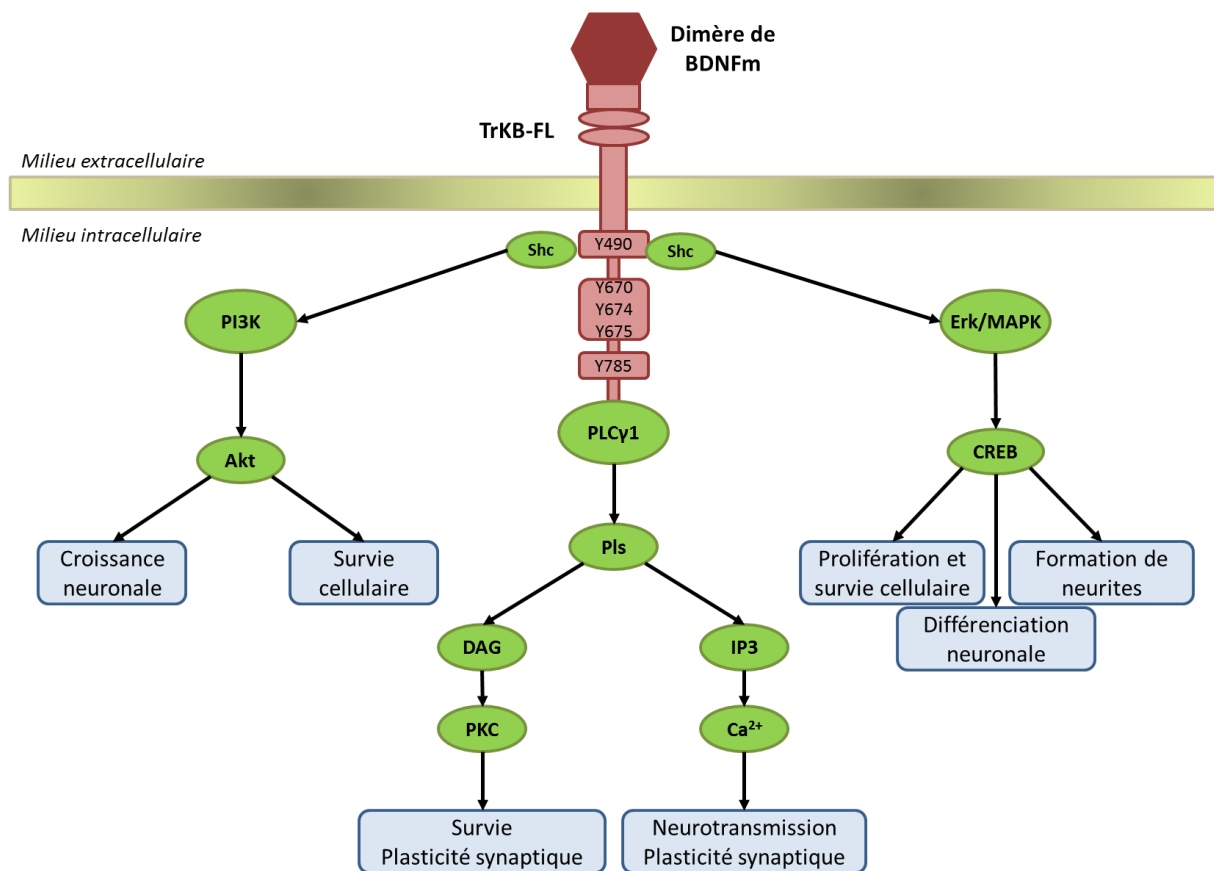


Figure 11 - Voies de signalisation déclenchées par l'activation du récepteur TrkB suite à la fixation du BDNFm. D'après Fenner (2012).

En ce qui concerne les isoformes tronquées TrkB-T1 et T2, celles-ci sont capables de lier le BDNFm avec la même affinité que le récepteur complet TrkB-FL, mais l'absence de site tyrosine kinase et de site de fixation de PLC- γ 1 rend leur fonction mal connue. Certaines études suggèrent que TrkB-T1 pourrait inhiber l'induction de la cascade de signalisation déclenchée par l'activation de TrkB-FL (Biffo et al., 1995, Stoilov et al., 2002, Fenner, 2012). Cependant, une étude datant de 2009 propose que l'activation des TrkB tronqués pourrait

tout de même être impliquée dans la survie et la prolifération neuronale, *via* un mécanisme impliquant le calcium (Islam et al., 2009).

Le récepteur TrkB-FL a été mis en évidence au niveau de multiples structures cérébrales telles que le cortex, le cervelet, le striatum, l'hippocampe, le thalamus, et l'hypothalamus, mais également dans le cœur et les vaisseaux au niveau périphérique (Drake et al., 1999, Ohira et al., 1999, Stoilov et al., 2002, Luberg et al., 2010). A l'étage cellulaire, le récepteur TrkB est présent au niveau des neurones, des cellules gliales, des cellules endothéliales, des cellules musculaires des vaisseaux et des cardiomyocytes (Nemoto et al., 1998, Kim et al., 2004, Fenner, 2012, Okada et al., 2012).

b) $p75^{NTR}$ /Sortiline

$p75^{NRT}$ est une glycoprotéine transmembranaire de type 1 appartenant à la superfamille des récepteurs TNF (tumor necrosis factor), composée de trois domaines spécifiques. Un domaine extracellulaire, caractéristique de la superfamille des TNF, composé de quatre motifs riches en cystéine, un domaine transmembranaire unique, et enfin d'un domaine intracellulaire commun aux autres membres de cette superfamille constitué d'un site de mort cellulaire. Ce récepteur est connu pour lier les pro-neurotrophines et activer des voies de signalisation opposées à celles engagées lors de l'activation de TrkB. Ces voies de signalisation sont nombreuses et médiées par plusieurs protéines adaptatrices notamment : Traf6, NRIF (neurotrophin receptor-interacting factor), NRAGE (neurotrophin receptor $p75$ interacting MAGE homologue), SC1 (schwann cell factor 1), RhoGDI et d'autres protéines (Yamashita et al., 2005). L'une des voies majeure déclenchée par $p75^{NRT}$ est la cascade de signalisation de la kinase Jun, aboutissant à l'activation de p53 et de l'apoptose. Cette cascade induit également l'expression du ligand Fas par les cellules neuronales, activant leur mort par apoptose *via* l'activation du récepteur Fas.

Le récepteur $p75^{NRT}$ possède un co-récepteur membranaire, la sortiline, membre d'une famille de protéines contenant un domaine Vps10p fortement exprimé dans le cortex et l'hippocampe (Petersen et al., 1997, Hermans-Borgmeyer et al., 1999, Sarret et al., 2003). Tous deux participent directement à la liaison avec le ligand, la sortiline se liant à la région contenant le pro-domaine du BDNF (Chen et al., 2005b). La co-expression de $p75^{NRT}$ et de la sortiline est indispensable à l'action pro-apoptotique du proBDNF (Teng et al., 2005). L'ensemble de ces mécanismes est représenté schématiquement dans la figure 12.

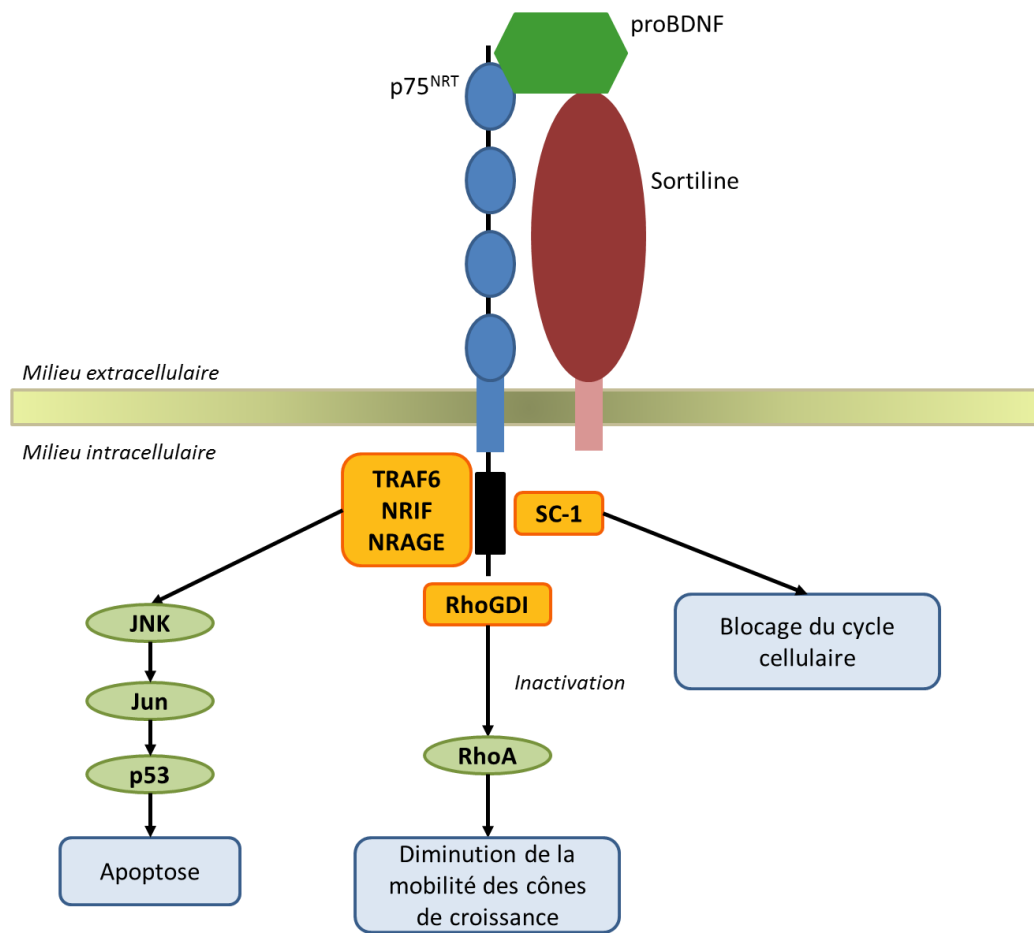


Figure 12 - Voies de signalisation déclenchées par l'activation des récepteurs p75^{NRT}/Sortiline suite à la fixation du proBDNF.

2. Effets centraux du BDNF mature

Son interaction avec le récepteur TrkB confère au BDNFm de multiples propriétés. Il est en effet connu pour son rôle dans l'embryogenèse du système nerveux (Huang and Reichardt, 2003, Kawamura et al., 2007, Cohen-Cory et al., 2010), mais également chez l'adulte pour son implication dans la synaptogenèse (Hall et al., 2000, Gomez-Palacio Schjetnan and Escobar-Rodriguez, 2007), la neurogenèse (Zigova et al., 1998, Pencea et al., 2001) et la vasculogenèse (Kim et al., 2004). Le BDNFm joue un rôle indispensable dans le déclenchement et le maintien de la potentialisation à long-terme (LTP), définit comme le renforcement durable de l'efficacité de la transmission synaptique (Pang et al., 2004, Lu et al., 2005). De plus, le BDNFm est connu pour favoriser la survie neuronale (Lindholm et al., 1993, Cheng and Mattson, 1994).

D'un point de vue fonctionnel, la forme mature du BDNF joue un rôle central dans les mécanismes impliqués dans l'apprentissage et la mémoire (Pang et al., 2004, Lu et al., 2008), la régulation de l'humeur (Kozisek et al., 2008, Chourbaji et al., 2011), le contrôle du comportement alimentaire (Nakazato et al., 2012), le retard d'apparition des signes cliniques des maladies neurodégénératives (Phillips et al., 1990, Levivier et al., 1995, Mogi et al., 1999, Peng et al., 2005) ou dans la récupération fonctionnelle post-AVC (Tsukahara et al., 1994, Kokaia et al., 1995, Schabitz et al., 2000, Mattson, 2008).

Le polymorphisme Val66Met, connu pour être à l'origine d'une diminution de la sécrétion activité dépendante de BDNF (Egan et al., 2003, Chen et al., 2004, Chen et al., 2005b) entraîne chez les sujets hétérozygotes une diminution de la mémoire épisodique, de l'activation de l'hippocampe en réponse à une stimulation cognitive (Egan et al., 2003, Hariri et al., 2003) et de la récupération fonctionnelle post-AVC (Kim et al., 2013). En outre, ce polymorphisme est à l'origine d'un risque accru de développement de dépression, de maladies psychiatriques et de maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer et de Parkinson (Boulle et al., 2012, Lee et al., 2013b).

3. Effets centraux du proBDNF

Comme décrit précédemment, l'activation des récepteurs $p75^{\text{NRT}}$ par le proBDNF est à l'origine du déclenchement de processus apoptotiques neuronaux (II-C-1-b) (Lee et al., 2001, Lu et al., 2005, Barker, 2009, Greenberg et al., 2009). En sus de ses effets pro-apoptotiques impliquant $p75^{\text{NRT}}$, l'activation de ce récepteur donne au proBDNF la capacité de déclencher le processus de dépression à long terme (LTD), un phénomène débouchant sur la mise sous silence de la synapse (Pang et al., 2004, Woo et al., 2005). Ainsi, le proBDNF exercerait, encore une fois, des effets opposés au BDNFm.

Cependant, les effets du proBDNF ici décrits ont été obtenus exclusivement *in vitro*, l'existence d'effets *in vivo* reste encore à démontrer.

4. Effets centraux du pro-domaine du BDNF

Le pro-domaine est issu du clivage du proBDNF en BDNFm. A l'heure actuelle, le devenir du pro-domaine une fois clivé est inconnu, mais une étude récente s'est intéressée à la fonction de ligand du pro-domaine, notamment en cas de polymorphisme Val66Met du BDNF (Anastasia et al., 2013). Ainsi, les auteurs ont constaté que le pro-domaine issu du

polymorphisme Val66Met modifie profondément la morphologie neuronale, car il induit la rétraction des cônes de croissance.

De manière intéressante, le pro-domaine du BDNF a été détecté *in vivo* à des taux élevés dans l'hippocampe et est sécrété de manière activité-dépendante par les neurones hippocampiques *in vitro* (Bath et al., 2012). Pour l'heure, son rôle physiologique est encore inconnu.

D. Rôle du BDNF en conditions ischémiques

De nombreux travaux ont porté sur le BDNF en conditions ischémiques. Celui-ci a été majoritairement mesuré dans le cerveau au cours d'études pré-cliniques et dans le sang au cours d'études cliniques.

1. Effets de l'ischémie sur les taux cérébraux de BDNF

Ces différents travaux ont caractérisé l'effet de l'ischémie sur la production de BDNF, en évaluant l'expression des ARNm codant le BDNF et/ou les taux de protéine totale après induction d'une ischémie focale ou globale (transitoire ou permanente).

Les études utilisant les modèles d'ischémie globale se sont principalement focalisées sur l'hippocampe. Il a ainsi été observé que l'ischémie est à l'origine d'une induction précoce du gène *bdnf* dans tout l'hippocampe avec une expression plus marquée et durable dans les cellules épargnées par la mort neuronale. De ces données a émergé l'hypothèse selon laquelle le BDNF serait neuroprotecteur, et que sa synthèse en cas d'ischémie serait un mécanisme de défense du cerveau. Concernant la protéine BDNF, ses taux diminuent aux temps longs dans CA₁, la région hippocampique la plus vulnérable à l'ischémie (Kokaia et al., 1996, Yang et al., 2002, Lee et al., 2011). Ce phénomène serait un reflet de la mort neuronale.

Les études qui se sont intéressées aux effets d'une ischémie focale sur les taux de BDNF ont soit utilisé un modèle d'ischémie focale par occlusion de l'artère cérébrale moyenne (MCAO) soit un modèle d'ischémie focale par photothrombose. Les modèles de MCAO ont permis de mettre en évidence une augmentation des ARNm codant *bdnf* dans les régions corticales non lésées après une ischémie transitoire de 15 minutes et une augmentation des ARNm étendue à l'hippocampe après une ischémie transitoire de 2h

(Kokaia et al., 1995). Ces résultats suggèrent que l'impact de l'ischémie sur la synthèse de BDNF est dépendant de sa durée et de la région considérée.

Une étude utilisant, cette fois, le modèle d'ischémie focale par photothrombose a mis en évidence des taux augmentés de BDNF aux temps 1 et 7 jours dans le cortex ipsilatéral à la lésion, sans modification dans le cortex contralatéral (Sulejczak et al., 2007). Avec ce modèle d'ischémie, notre laboratoire (Madinier et al., 2009) a confirmé que l'ischémie modifie les taux de BDNF dans le cortex ipsilatéral et a montré que les variations des taux de BDNF sont limitées à la phase aiguë de l'ischémie. Dans une étude plus récente dissociant les deux formes de BDNF (proBDNF et BDNFm), notre équipe a rapporté une augmentation précoce (4h après ischémie) du BDNFm dans le cortex des 2 hémisphères suivie d'une augmentation tardive (8 et 30 jours après ischémie) au niveau des hippocampes (Madinier et al., 2013). En ce qui concerne l'expression du proBDNF, cette étude montre une diminution à 24h, 8 jours et 30 jours au niveau de la lésion et au niveau de l'hippocampe contralatéral, ainsi qu'une augmentation à 4h au niveau périlésionnel. Ces résultats suggèrent donc que l'évolution des taux de proBDNF et de BDNFm après un AVC est dépendante de la région cérébrale. De plus, la différence d'expression du proBDNF entre les territoires hippocampiques tend à indiquer l'existence d'une hétérogénéité dans la régulation du gène *bdnf*, et souligne la complexité des modifications post-AVC dans le contrôle de l'expression génique du BDNF (Madinier et al., 2013).

Les résultats de nombreuses études se sont accordés pour présenter le neurone comme la source majeure de BDNF à la phase aiguë de l'ischémie (Comelli et al., 1992, Kokaia et al., 1995, Rickhag et al., 2007). Cependant, l'étude de Madinier *et al.* en 2009 a mis en évidence la présence de BDNF dans la microglie à la phase aiguë de l'infarctus, tandis que d'autres études ont identifié la protéine dans les astrocytes formant la cicatrice gliale à la phase tardive (Sulejczak et al., 2007, Sato et al., 2009, Uchida et al., 2010, Quirie et al., 2013). Sur un modèle d'ischémie focale par microembolisation, notre laboratoire a rapporté dans l'hémisphère embolisé une surexpression de BDNF au niveau des neurones et des épendymocytes (à 4h), des cellules endothéliales (à 4h et 24h), des cellules microgliales (à 24h) et des astrocytes (à 8j) (Bejot et al., 2011c). Ces résultats semblent refléter la capacité de toutes les cellules à synthétiser la neurotrophine en conditions ischémiques et seraient en accord avec plusieurs études menées *in vitro* (Miklic et al., 2004, Saha et al., 2006, Jean et al., 2008, Lai and Todd, 2008). L'ensemble de ces données suggère que toutes les cellules

sont potentiellement capables de participer à la neuroplasticité post-lésionnelle en cas d'AVC.

2. Effets de l'ischémie sur les taux circulants de BDNF

Les taux circulants de BDNF sont considérés par les neurologues et les psychiatres comme un reflet des taux cérébraux, et sont donc utilisés comme un moyen d'évaluation des taux de BDNF présents dans le cerveau. Néanmoins, peu d'études se sont penchées sur l'impact de l'ischémie sur les taux circulants de BDNF. De plus, la quasi-totalité des données disponibles ont été obtenues chez l'Homme. Quatre études se sont donc intéressées à l'impact de l'AVC sur les taux circulants de BDNF, dont trois se sont focalisées sur le couple BDNF/dépression post-AVC. Les principaux résultats sont répertoriés dans le tableau 5.

Tableau 5 - Tableau récapitulatif des différentes études portant sur l'effet de l'ischémie sur les taux circulants de BDNF chez l'Homme.

Etude	Patients (nombre et caractéristiques)	Matériel et Méthodes : Quoi ? Quand ? Comment ?	Résultats
(Di Lazzaro et al., 2007)	10 patients AVC<24h	Dosage du BDNF plasmatique par ELISA à J0 (admission du patient), J1, J2, J3.	<ul style="list-style-type: none"> ✓ ↑taux plasmatiques de S100β (rupture de la BHE). ✓ Pas de variations des taux de BDNF. <p>MAIS</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Faible nombre de patients. ✓ Peu de patients présentant un déficit neurologique sévère. ✓ Délai de prélèvement tardif et très variable (10,7h±7,6). <p>Absence de données sur le volume de lésion final</p>
(Jimenez et al., 2009)	134 patients AVC Pas d'antécédents de dépression	Dosage du BDNF sérique par ELISA à J7 et J30	Pas de différence entre les taux sériques de BDNF des patients présentant une dépression post-AVC (PSD) et les patients indemnes.
(Yang et al., 2011)	100 patients AVC<24h 3 groupes : • Patients avec PSD avant J14 • Patients sans PSD • Sujets contrôles	Dosage du BDNF sérique par ELISA à J1 (le lendemain de l'admission) et à J7	<ul style="list-style-type: none"> ✓ A J1 : taux de BDNF des patients sans PSD supérieurs à ceux des patients avec PSD et à ceux des sujets contrôles. ✓ A J7 : pas de différence. ✓ Taux de BDNF sérique bas à J1 associé avec un risque accru de développement de PSD : un taux <5,86 ng/ml prédit ce risque avec une sensibilité de 81% et une spécificité de 86%. <p>→ Selon les auteurs, des taux élevés de BDNF sérique pourraient refléter les taux cérébraux, et témoigner d'un mécanisme de protection contre l'apparition d'une PSD.</p>
(Zhou et al., 2011)	93 patients AVC	Dosage du BDNF sérique par ELISA à J7, et entre M3 et M6	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Taux de BDNF sériques mesurés entre M3 et M6 significativement plus bas chez les patients avec PSD. ✓ Pas de corrélation entre les taux sériques de BDNF et la présence d'un polymorphisme Val66Met.

L'analyse des résultats montrent que des taux bas de BDNF sérique sont associés à un risque de dépression, suggérant que le BDNF circulant après un AVC serait un reflet des taux cérébraux de BDNF.

Dans ce contexte, le laboratoire a été le premier à étudier chez le Rat l'effet de l'ischémie cérébrale sur les taux circulants de BDNF et le lien existant entre ces taux circulants et les taux cérébraux (Bejot et al., 2011b). Les résultats montrent qu'une ischémie multifocale permanente augmente les taux de BDNF dans le cerveau mais ne modifie pas les taux circulants de BDNF mesurés dans les 7 jours qui suivent l'ischémie. Plus tard, une équipe slovaque s'est concentrée sur l'impact de 2 modèles d'ischémie transitoire (focale et globale) sur les taux de BDNF dans le sang total et le plasma (Gottlieb et al., 2013). Ces résultats montrent une augmentation précoce des taux de BDNF dans le sang total et retardée dans le plasma. Les auteurs concluent que l'ischémie augmenterait la synthèse et la sécrétion de BDNF par les globules blancs circulants.

3. Rôle du BDNF en cas d'ischémie

De nombreuses études se sont intéressées au rôle cérébral du BDNF après une ischémie. Pour cela, différentes stratégies ont été employées, certaines ayant pour objectif de bloquer l'effet du BDNF (antagonistes des récepteurs TrkB, souris KO BDNF), d'autres d'administrer du BDNF ou de potentialiser sa production cérébrale. Ces travaux ont mis en évidence le rôle majeur du BDNF dans les processus de neuroprotection et de neuroplasticité.

a) Rôle neuroprotecteur

En faveur d'un rôle neuroprotecteur du BDNF, différentes études ont montré que l'administration précoce de BDNF par voie systémique, intraventriculaire, intraparenchymateuse ou encore intranasale, diminue la mort neuronale induite par une ischémie globale transitoire (Beck et al., 1994, Tsukahara et al., 1994, Wu and Pardridge, 1999, Jiang et al., 2011) et le volume d'infarctus dans les modèles d'ischémie focale (Schabitz et al., 1997, Yamashita et al., 1997). Ces résultats sont en accord avec l'étude d'Endres *et al.* (2000) montrant que le volume d'infarctus induit par une ischémie focale est plus élevé chez les souris KO BDNF que chez les souris sauvages. Plus récemment, l'administration d'un

agoniste des récepteurs TrKB, le 29D7, s'est montrée capable d'améliorer la survie neuronale dans un modèle d'ischémie néo-natale (Kim et al., 2014).

b) Rôle dans les processus de neuroplasticité

L'hypothèse de l'implication du BDNF dans la mise en place de la neuroplasticité post-lésionnelle a été étayée par différentes études ayant mis en évidence que l'administration i.v. de BDNF à faible dose améliore la récupération sensorimotrice, ainsi que les performances comportementales et cognitives sans modifier le volume de lésion (Kiprianova et al., 1999, Schabitz et al., 2004, Schabitz et al., 2007, Muller et al., 2008). Par ailleurs, les stratégies qui augmentent les taux cérébraux de BDNF sont capables de réduire le déficit fonctionnel induit par l'ischémie cérébrale. Parmi ces stratégies, on peut citer :

- La thérapie cellulaire : transplantation intracérébrale de cellules de moelle osseuse (Chen et al., 2000) ou de cellules souches neuronales génétiquement modifiées surexprimant le BDNF (Zhu et al., 2011) ou encore administration systémique ou locale de cellules microgliales humaines (Narantuya et al., 2010).
- L'activité physique imposée (sur tapis roulant) ou volontaire (roue d'entraînement) (Kim et al., 2005, Ploughman et al., 2009, Ke et al., 2011, Quirie et al., 2012, Ambrogini et al., 2013).
- Les thérapies médicamenteuses utilisant par exemple l'atorvastatine (Chen et al., 2005a), le nefiracetam (Ando et al., 2005) ou encore la fluoxétine (Windle and Corbett, 2005, Seo et al., 2014).

En outre, le BDNF jouerait un rôle positif dans la récupération fonctionnelle et cognitive *via* des processus de potentialisation de la neurogenèse et de l'angiogenèse (Schabitz et al., 2007, Keiner et al., 2009, Qin et al., 2011).

Si actuellement, la communauté scientifique considère le BDNF comme bénéfique, il nous faut tout de même citer quelques études qui ont montré que les souris KO BDNF présentent une récupération neurologique plus importante que les souris sauvages pour un volume de lésion identique (Nygren et al., 2006), et que l'environnement enrichi, qui exerce des effets positifs sur la plasticité post-lésionnelle et la récupération fonctionnelle post-AVC, est associé à une réduction des taux cérébraux de BDNF (Zhao et al., 2000, Zhao et al., 2001).

III. L'ACTIVATEUR TISSULAIRE DU PLASMINOGENE

Le t-PA est une sérine protéase dont les propriétés fibrinolytiques ont été découvertes en 1902 par Conradi. Ce n'est qu'en 1979 que le t-PA fut purifié (Binder et al., 1979, Rijken et al., 1979) et en 1983 qu'il fut séquencé (Pennica et al., 1983). Le gène du t-PA est localisé sur le chromosome 8 chez l'Homme et sur le chromosome 16 chez le Rat.

Depuis 1981, le t-PA est connu pour être également synthétisé au niveau du cerveau par les neurones et les cellules gliales. Il y exerce, entre autres, un rôle de neuromodulateur et possède des propriétés cytokine-like

Nous nous proposons donc dans cette partie de décrire les différents rôles du t-PA dans les compartiments vasculaires et cérébraux.

A. Données générales concernant le t-PA

1. Structure du t-PA

Le t-PA est une glycoprotéine d'environ 70 kDa constituée de 527 acides aminés, et de 2 chaînes : une chaîne lourde (chaîne A) et une chaîne légère (chaîne B)(Collen and Lijnen, 2004)(Figure 3).

La chaîne A est composée de 4 domaines:

- Le domaine « Finger » ou Fibronectine-type 1, constitué des résidus 4 à 46 et situé à proximité de l'extrémité N-terminal. Ce domaine est capable de se lier à différents constituants (Downing et al., 1992, Siao and Tsirka, 2002, Gonzalez-Gronow et al., 2013):
 - La fibrine.
 - L'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1).
 - La neuroserpine.
 - L'annexine-II
 - les canaux anioniques voltage dépendants (VDAC)
- Le domaine EGF-like (epidermal growth factor-like, résidus 47-85), est un domaine de 39 acides aminés homologue du facteur de croissance épidermique. Il stabilise le site catalytique du t-PA (Urano et al., 1989, Smith et al., 1995) et se lie aux low-

density lipoprotein receptor-related protein (LRP) (Collen et al., 1988, Kalyan et al., 1988, Larsen et al., 1989).

- Deux domaines kringle, kringle 1 (résidus 92-173) et kringle 2 (résidus 180-261), qui partagent une homologie avec les domaines kringle du plasminogène. Le domaine kringle 1 interagit avec le récepteur au mannose (Lee et al., 2007b) (Kuiper et al., 1996). Le domaine kringle 2 est quant à lui impliqué :
 - Dans la stimulation de l'activité du t-PA par la fibrine (Collen et al., 1990),
 - Dans la liaison à la sous-unité GluN1 des récepteurs NMDA (Nicole et al., 2001, Fernandez-Monreal et al., 2004a, Lopez-Atalaya et al., 2008),
 - Dans l'interaction avec le PAI-1 (de Serrano and Castellino, 1990),
 - Dans l'interaction avec le Platelet-derived growth factor CC (PDGF-CC) (Fredriksson et al., 2004, Fredriksson et al., 2005).
- La chaîne B est quant à elle composée d'un domaine protéasique, situé à proximité de l'extrémité C-terminale (résidus 276-526) et dont le site actif est constitué de l'histidine 322, de l'asparagine 371 et de la sérine 478. C'est sur cette chaîne qu'est localisée l'activité catalytique du t-PA (Figure 13).

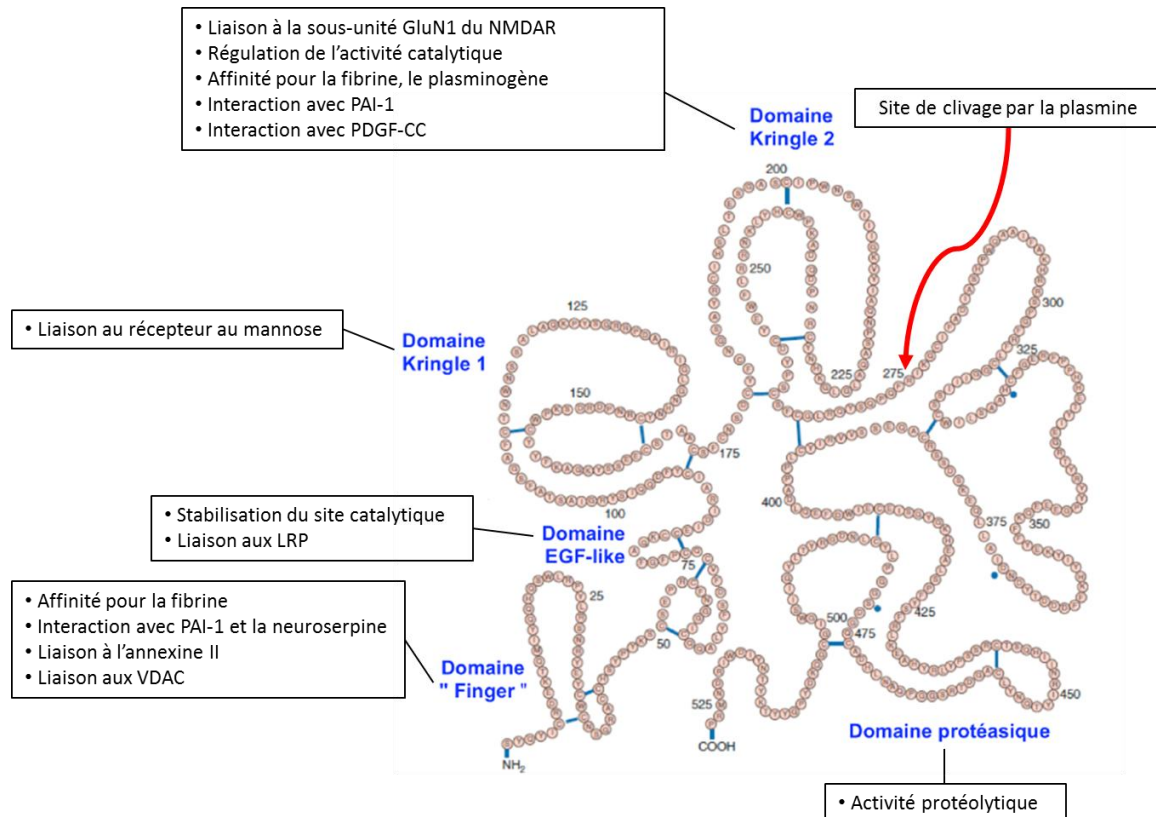


Figure 13- Structure et fonctions des différents domaines du t-PA (D'après Vivien *et al.*, 2011).

Les deux chaînes peuvent être séparées par clivage protéolytique entre l'Arginine 275 et l'Isoleucine 276 par le facteur XI, la kallikréine, l'urokinase (u-PA) et la plasmine (Figure 9) (Rijken and Groeneveld, 1986). Une fois clivé, le t-PA passe de la forme simple chaîne (sc-t-PA) à la forme double chaîne (tc-t-PA), dans laquelle les deux chaînes sont maintenues ensemble par un pont disulfure entre la cystéine 99 de la chaîne A et la cystéine 430 de la chaîne B (Rouf et al., 1996). Le sc-t-PA est un zymogène exceptionnel qui ne nécessite pas de traitement protéolytique pour être actif mais la présence de son régulateur allostérique, la fibrine. Les différents effets de ces deux formes seront décrits plus tard dans ce chapitre.

2. Sources cellulaires du t-PA

Outre les cellules endothéliales, le t-PA est également produit au niveau circulant par les monocytes, les mégacaryocytes, les cellules mésothéliales, les mastocytes, les fibroblastes cardiaques et au niveau du parenchyme cérébral par les neurones, les astrocytes, la microglie et les oligodendrocytes (Levin and Loskutoff, 1982, Correa et al., 2011, Lemarchant et al., 2012, Li et al., 2014).

3. Régulation de la sécrétion de t-PA

Les cellules endothéliales synthétisent et sécrètent le t-PA de manière constitutive et de manière régulée selon un mécanisme dépendant du Ca^{2+} (van den Eijnden-Schrauwen et al., 1995).

Différents agents sont capables d'augmenter la sécrétion régulée de t-PA par l'endothélium :

- Les facteurs de la coagulation tels que la thrombine et le facteur Xa (Emeis, 1992).
- Les agents vasomoteurs tels que la bradykinine (un peptide inflammatoire vasodilatateur) (Brown et al., 2000), la substance P (un neurotransmetteur) (O'Connor et al., 2004).
- Les substances adrénérquiques tels que la noradrénaline (Jern et al., 1994) et l'isoprénaline (Stein et al., 1998), mais également les phénomènes capables d'augmenter l'activité sympathique comme le déclenchement d'un stress (Jern et al., 1997) ou l'exercice physique (el-Sayed, 1996). De plus, il

semblerait que les neurones sympathiques soient capables eux-mêmes de synthétiser et de sécréter le t-PA (Jiang et al., 2002).

- L'adénosine et l'uridine triphosphates (ATP et UTP) *via* l'activation des récepteurs purinergiques P2Y (Hrafnkelsdottir et al., 2001). Ces résultats sont intéressants car ces deux nucléotides sont relargués par les plaquettes activées, les cellules endothéliales et les cardiomyocytes au cours de l'ischémie.
- Le monoxyde d'azote (NO) dont le rôle dans le mécanisme de sécrétion endothéliale du t-PA est encore incertain et controversé. Par exemple, le relargage du t-PA induit par la substance P est bloqué par l'inhibiteur de la NO synthase, le N^G monométhyl-L-arginine (L-NMMA) (Newby et al., 1998), tandis que la sécrétion déclenchée par la bradykinine est, selon les études, soit non affectée (Brown et al., 2000) soit augmentée par le L-NMMA (Smith et al., 2003). Ainsi, le rôle du NO reste sujet à débat, mais s'il n'induit pas à lui seul la libération de NO, il pourrait jouer un rôle permissif ou synergique dans ce phénomène.
- Les contraintes de cisaillement (shear-stress) exercées par le sang sur l'endothélium. Ce mécanisme bien décrit dans les modèles de culture de cellules endothéliales (Diamond et al., 1990) est là encore controversé (Metallo et al., 2008). Le shear stress serait capable de stimuler l'expression du t-PA et d'augmenter son stockage intracellulaire sans toutefois favoriser sa sécrétion (Sjogren et al., 2000).

L'ensemble de ces mécanismes est représenté schématiquement dans la figure 14.

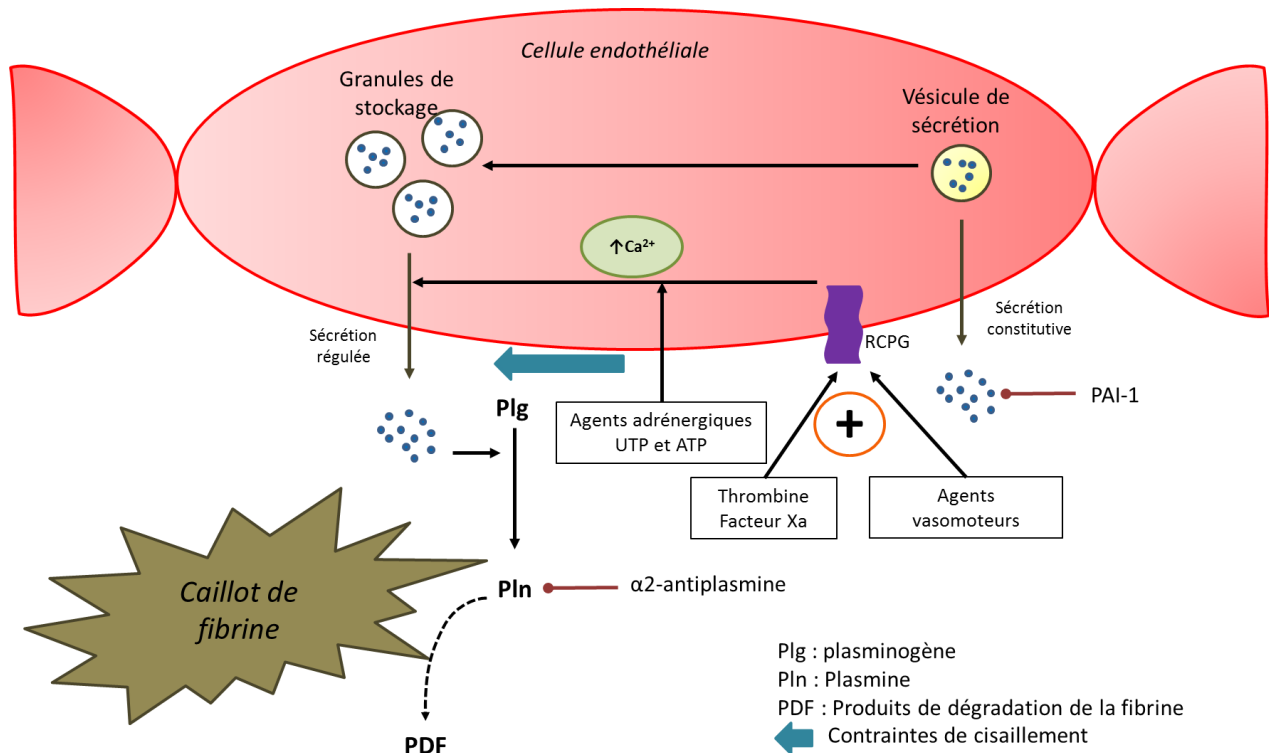


Figure 14 - Stimulation de la sécrétion de t-PA par l'endothélium vasculaire.
D'après Oliver *et al.*, 2005.

4. Les inhibiteurs du t-PA

On peut citer deux types d'inhibiteurs du t-PA : les inhibiteurs endogènes comprenant le PAI-1, le PAI-2, la neuroserpine et la protéase nexine 1 (PN-1), et les inhibiteurs de synthèse comprenant le diisopropylfluorophosphate (DFP), le phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) et le 2,7-Bis-(4-Amidinobenzylidène)-Cycloheptan-1-one dihydrochlorure (t-PA STOP).

a) Les inhibiteurs endogènes

Le PAI-1, également appelé serpine E1, a été initialement identifié dans une culture de cellules endothéliales (Loskutoff *et al.*, 1983), avant d'être reconnu comme pouvant être produit par de nombreux autres tissus et types cellulaires (Van De Craen *et al.*, 2012), notamment les hépatocytes (Simpson *et al.*, 1991). Il se lie au domaine « Finger » du t-PA mais le domaine kringle 2 est également capable d'interagir avec le PAI-1 (de Serrano and Castellino, 1990). Il existe un autre inhibiteur de l'activateur du plasminogène, le PAI-2, qui

possède une affinité plus importante pour l'u-PA que pour le t-PA, et est principalement sécrétée pendant la grossesse (Medcalf and Stasinopoulos, 2005).

Au niveau du parenchyme cérébral, le t-PA peut être inhibé par la neuroserpine, présente quasi exclusivement dans le système nerveux, et la protéase nexine 1 (PN-1) retrouvée dans la plupart des tissus (Potempa et al., 1994).

La neuroserpine se lie au t-PA *via* son domaine « Finger ». Elle est exprimée et sécrétée par les neurones du système nerveux central et périphérique, surtout à la fin du développement lors de la migration des neurones et de la formation des synapses (Miranda and Lomas, 2006). Dans le cerveau adulte, son expression est principalement localisée dans le cortex, l'hippocampe et l'amygdale (Krueger et al., 1997). Bien que considérée pendant longtemps comme uniquement centrale, la neuroserpine est également exprimée dans le pancréas, le cœur, les reins et les testicules (Miranda and Lomas, 2006). De manière intéressante, l'inhibition du t-PA par la neuroserpine est plus élevée en milieu acide que neutre (Barker-Carlson et al., 2002). Cette particularité pourrait être importante en cas d'ischémie cérébrale au cours de laquelle la zone en souffrance est le siège d'une acidose tissulaire (Lipton, 1999).

La PN-1 ou serpine E2 est principalement exprimée dans le cerveau, le cœur, le système vasculaire et est également retrouvée dans les organes reproducteurs, les reins, les poumons, le cartilage, la rate et les muscles (Bouton et al., 2012). En revanche, la PN-1 est à peine détectable dans le plasma (Baker and Gronke, 1986), même si elle semble exercer une action complémentaire de celle de PAI-1 dans la résistance des caillots sanguins à leur dégradation en agissant sur les complexes t-PA/plasmine liés à la fibrine (Bouton et al., 2012). Ainsi, le temps de reperfusion des vaisseaux occlus après fibrinolyse induite par le t-PA est très nettement réduit chez les animaux n'exprimant pas la PN-1 (Boulaftali et al., 2011).

b) Les inhibiteurs de synthèse

Le traitement avec les inhibiteurs chimiques de sérine protéase DFP ou PMSF aboutit à une liaison covalente de l'inhibiteur avec le t-PA au niveau de son site catalytique et donc à une inhibition irréversible (Klocking et al., 1984). Les autres inhibiteurs comme les bisbenzamidines, famille à laquelle appartient le t-PA STOP, interagissent avec le site

catalytique mais ne forment pas de liaison covalente (Renatus et al., 1997). L'inhibition est dans ce cas réversible.

5. Les récepteurs du t-PA

On décrit deux types de récepteurs fixant le t-PA : les récepteurs qui vont potentialiser son activité protéolytique (récepteurs pro-fibrinolytiques) et les récepteurs impliqués dans sa clairance.

a) Les récepteurs pro-fibrinolytique

L'Annexine-II est le représentant majeur de cette catégorie de récepteurs. C'est une protéine cytosolique de 36 kDa pouvant être retrouvée dans le cytoplasme sous forme d'un monomère libre, mais qui est également capable de s'ancrer à la membrane cytoplasmique et former un hétérotétramère avec la protéine S100A10 ou p11 (Luo and Hajjar, 2013). Cette protéine peut lier le t-PA *via* son domaine N-terminal et le plasminogène *via* son domaine C-terminal sur deux sites différents, créant ainsi un complexe ternaire qui potentialise l'activation du plasminogène par le t-PA (Kang et al., 1999, Fan et al., 2010). La localisation subcellulaire de l'Annexine-II semble régie par la concentration intracellulaire en Ca^{2+} , le pH ou encore la composition en phospholipides de la membrane (Gerke et al., 2005). L'Annexine-II est capable de transporter le calcium et est exprimée sur les cellules endothéliales, les plaquettes, les monocytes, les neutrophiles, les cellules musculaires lisses et la microglie (Hajjar and Acharya, 2000). L'association entre le rt-PA et une forme recombinante de l'Annexine-II (rA2) s'est montrée plus efficace que le rt-PA seul chez l'animal soumis à une ischémie cérébrale (Zhu et al., 2010, Wang et al., 2014). Ainsi, la combinaison de rA2 (5 mg/kg) et d'une dose faible de rt-PA (2,5 mg/kg) comparée à l'utilisation de rt-PA seul (10 mg/kg) augmente la fibrinolyse tout en diminuant le volume de lésion, le risque hémorragique et la mortalité (Zhu et al., 2010). De plus les rats Wistar traités par le rt-PA 5 mg/kg associé à de la rA2 10 mg/kg présentent une augmentation de l'expression du VEGF et de la synaptophysine dans la zone périlésionnelle 28 jours après l'ischémie et ce, en comparaison aux animaux traités uniquement par rt-PA à la dose habituellement utilisée chez le rongeur (10 mg/kg) (Wang et al., 2014). Cette association pourrait donc permettre de potentialiser l'effet fibrinolytique du rt-PA tout en minimisant ses effets indésirables.

Dans la catégorie des récepteurs pro-fibrinolytiques du t-PA, il nous faut désormais citer les canaux anioniques voltage-dépendant (VDAC). Ce sont de petites protéines de 30 à 35 kDa retrouvées au niveau de la membrane plasmique de nombreux types cellulaires, capables de se lier au domaine kringle 5 du plasminogène (Banerjee and Ghosh, 2004) et au domaine « Finger » du t-PA (Gonzalez-Gronow et al., 2013) augmentant l'affinité du t-PA pour le plasminogène.

b) Les récepteurs impliqués dans la clairance

Ces récepteurs assurent l'élimination du t-PA circulant dont la demi-vie plasmatique est très courte : de 5 à 10 minutes chez l'Homme et 1 à 4 minutes chez le rongeur (Verstraete et al., 1985, Gravanis and Tsirka, 2008). Ces récepteurs sont exprimés par le foie, il s'agit des Low-Density Lipoprotein Receptor-related Protein (LRP) et du récepteur au mannose.

Les LRP sont capables de fixer le t-PA au niveau de son domaine « EGF-like », les complexes t-PA/PAI-1 et même le PAI-1. Cependant, en conditions physiologiques, seuls les complexes seraient internalisés.

Les récepteurs au mannose ont été peu étudiés. Le t-PA interagirait avec le récepteur au mannose *via* son domaine kringle 1 (Lee et al., 2007b). Plusieurs travaux datant du début des années 1990 ont mis en évidence l'implication du récepteur au mannose dans la clairance rapide du t-PA par le foie (Rijken et al., 1990). De plus, ce récepteur a été localisé au niveau des macrophages, pointant ainsi le rôle de ces derniers dans la régulation de la concentration en t-PA dans la circulation sanguine (Otter et al., 1991).

6. Rôle historique du t-PA dans la fibrinolyse

En présence d'un thrombus dans la microvascularisation, le t-PA est relargué par les cellules endothéliales dans le but de préserver la perméabilité des vaisseaux (Zlokovic et al., 1995). Son rôle est de dissoudre une thrombose constituée et de prévenir une accumulation de fibrine *via* l'activation du système plasminogène/plasmine.

Le plasminogène est le précurseur inactif de la plasmine. C'est une glycoprotéine d'environ 90 kDa retrouvée dans le plasma et dans les milieux extracellulaires. Il est constitué d'une seule chaîne peptidique contenant 791 acides aminés et 24 ponts disulfures (Schaller and Gerber, 2011). La molécule comprend 7 domaines structurels composés d'une

chaîne peptidique N-terminale dite de pré-activation suivie de 5 domaines kringle. L'extrémité de la chaîne comporte le site responsable de l'activité protéolytique (Petersen et al., 1990). Le t-PA va agir sur le plasminogène par hydrolyse de la liaison peptidique Arg561-Val562 pour donner naissance à une molécule de plasmine composée de deux chaînes. L'action catalytique du t-PA est intrinsèquement faible et peut être multipliée par 100 en présence de fibrine. En effet, cette dernière va former un complexe ternaire avec le t-PA et le plasminogène, potentialisant ainsi le clivage de ce dernier (Lebrazi, 2003). Le plasminogène est principalement synthétisé par le foie, mais il est également exprimé dans le parenchyme cérébral (Ortolano and Spuch, 2013).

La plasmine est l'enzyme responsable de la dégradation protéolytique de la fibrine. Il s'agit, là encore, d'une sérine protéase qui a la capacité de scinder la fibrine en produits de dégradation de la fibrine, également appelés D-dimères, solubles dans le plasma et emportés par le flux sanguin. La plasmine est également capable de cliver le proBDNF en BDNFm ou encore les proMMPs en MMPs. La plasmine libre est majoritairement neutralisée par l' α 2-antiplasmine, mais elle peut également être inhibée par l' α 2-macroglobuline (Lebrazi, 2003). L'action fibrinolytique du t-PA est représentée schématiquement dans la figure 15.

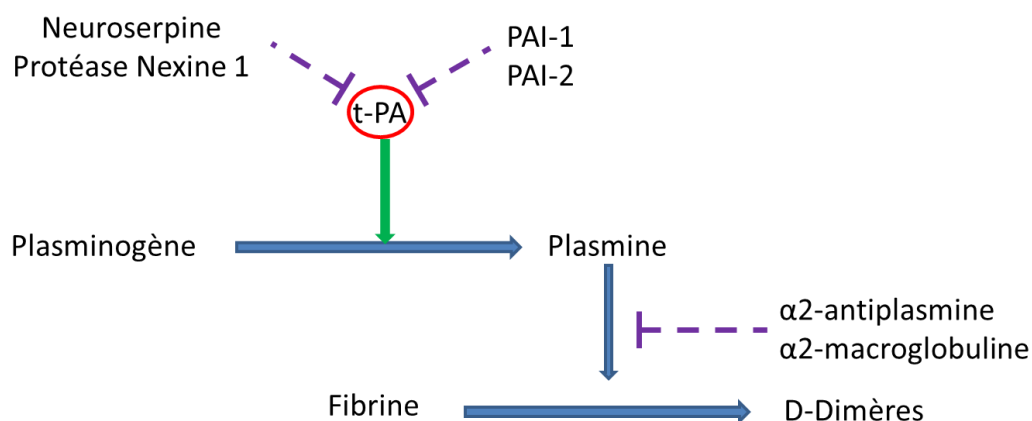


Figure 15- Action fibrinolytique du t-PA.

Comme expliqué précédemment, le t-PA existe sous deux formes : sc-t-PA et tc-t-PA. En présence de fibrine, le sc-t-PA et le tc-t-PA présentent la même activité enzymatique sur le plasminogène (Rijken et al., 1982, Thelwell and Longstaff, 2007), tandis qu'en son absence l'activité du sc-t-PA est plus faible (Loscalzo, 1988). Les deux formes du t-PA sont inhibées de manière similaire par l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1), tandis que la

neuroserpine présente une cinétique d'inhibition plus courte mais plus intense pour le tc-t-PA que pour le sc-t-PA (Barker-Carlson et al., 2002).

B. t-PA, Unité neurovasculaire et Barrière hémato-encéphalique

L'interface entre le sang et le parenchyme cérébral est formée par l'Unité Neurovasculaire (UNV), qui est composée de cellules endothéliales, d'une membrane basale, d'astrocytes périvasculaires, de microglie, de péricytes, de neurones et de matrice extracellulaire (Muio et al., 2014). La fonction principale de l'UNV est de réguler le passage bidirectionnel des substances entre le cerveau et l'espace vasculaire. Cette fonction de barrière, composant la barrière hémato-encéphalique (BHE), est définie par la présence de jonctions serrées entre les cellules endothéliales et par l'interaction entre les astrocytes périvasculaires et la membrane basale.

1. Passage de la BHE par le t-PA

Si la présence du t-PA dans le parenchyme cérébral est désormais connue (voir paragraphes suivants), la capacité du t-PA circulant à atteindre le cerveau en traversant la barrière hémato-encéphalique (BHE) a longtemps été discutée.

Pendant de nombreuses années, il était considéré par la communauté scientifique que le passage de la BHE par le t-PA n'était possible qu'en cas de lésion cérébrale. Ainsi, sur un modèle de lésion au kaïnate chez la souris KO t-PA, le t-PA a été détecté par zymographie au niveau de la lésion après son injection intraveineuse dans les régions présentant une rupture de la BHE (Tsirka et al., 1995, Zhang et al., 2002).

Cependant, l'étude Benchenane *et al.* (2005) montre que l'administration i.v. de t-PA potentialise l'excitotoxicité induite par une injection intrastriale de NMDA en dépit de l'absence de rupture de la BHE, suggérant que l'endothélium de la BHE possède un système de transport du t-PA. En effet, il est désormais admis que ce passage se ferait grâce à la liaison du t-PA avec le récepteur LRP *via* son domaine EGF et ce, de manière indépendante de son activité catalytique (Orth et al., 1994). Les LRP sont désormais reconnues comme un système de transport efficace permettant la transcytose des protéines du sang vers le cerveau telles que les lipoprotéines lipases, certaines metalloproteinases matricielles (MMP-9, MMP-13), certains facteurs de coagulations (IXa, VIIIa...) ou encore le PAI-1 (Fillebeen et al., 1999, Herz and Strickland, 2001, Aoki et al., 2002, Pan et al., 2004).

2. t-PA et rupture de la BHE

A la suite d'une ischémie cérébrale, on observe une altération des composants de l'UNV, incluant les jonctions serrées et la membrane basale, ce qui aboutit à une déstabilisation puis une rupture de la BHE (del Zoppo and Mabuchi, 2003). Ainsi, la BHE ne peut plus jouer pleinement son rôle de barrière et va permettre le passage de fluides entre le sang et la zone cérébrale ischémisée, ce qui va aboutir au développement d'un œdème et augmenter le risque de transformation hémorragique. Des études récentes montrent que le (r)t-PA aggrave la lésion de la BHE induite par l'ischémie. Une ouverture précoce de la BHE liée à un risque accru de transformation hémorragique a été montré par IRM chez les patients fibrinolyés par le rt-PA (Hjort et al., 2008, Kastrup et al., 2008, Kidwell et al., 2008, Kassner et al., 2009). De plus, les risques de rupture de la BHE et de transformation hémorragique (TH) sont doublés chez les patients fibrinolyés (Latour et al., 2004).

Les études menées chez le Rat soumis à une MCAO ont montré que l'activité t-PA de la membrane basale des microvaisseaux situés au niveau de la zone de pénombre est rapidement augmentée et associée à un accroissement de la perméabilité de la BHE (Yepes et al., 2003). De plus, la perméabilité de la membrane et le risque de transformation hémorragique sont aggravés par l'administration tardive de rt-PA (6h) chez le Rat ayant subi une ischémie cérébrale unilatérale par insertion d'un caillot sanguin dans l'une des carotides internes (Dijkhuizen et al., 2002). Ce phénomène pourrait mettre en jeu différents mécanismes schématisés ci-dessous (Figure 16) et qui seront décrits par la suite.

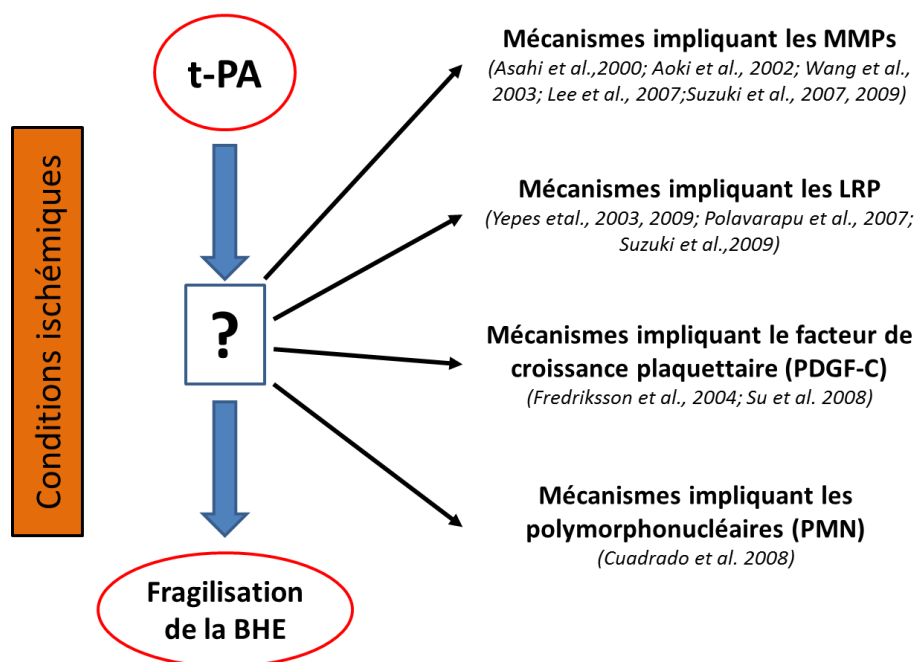


Figure 16 - Principales hypothèses mécanistiques impliquant le t-PA dans la fragilisation de la barrière hémato-encéphalique à la suite d'un épisode ischémique. D'après Montagne, 2012.

3. Mécanismes mis en jeu

Parmi les mécanismes évoqués dans la fragilisation de la BHE par le t-PA (endogène et/ou exogène), celle basée sur l'activation de métalloprotéinases matricielles (MMPs) a dominé ces dix dernières années. Ainsi, le t-PA est associé à une surexpression/suractivation des MMPs, notamment MMP-2, -3 et -9 (Aoki et al., 2002, Wang et al., 2003, Lee et al., 2007c, Suzuki et al., 2009), d'où une dégradation de la matrice extracellulaire et donc de la lame basale des capillaires cérébraux. Les animaux déficients en MMP-9 et en MMP-3 sont protégés de l'ouverture de la BHE post-fibrinolyse (Asahi et al., 2000, Suzuki et al., 2007). Dans une étude utilisant des animaux KO MMP-3, Suzuki et al. ont montré que cette protéase matricielle est nécessaire aux effets pro-hémorragiques du t-PA (Suzuki et al., 2007). L'activation de MMP-3 par le t-PA se ferait de manière indirecte grâce à la plasmine (Suzuki, 2010). Néanmoins, l'implication de la plasmine dans l'activation de MMP-9 n'a pas été démontrée. En effet, chez le rat hypertendu, l'administration de rt-PA 3h après le déclenchement d'une ischémie cérébrale focale transitoire augmente l'activation de MMP-9 dans le parenchyme cérébral, et ce phénomène n'est pas supprimé par l'administration d'acide tranexamique (TXA), un inhibiteur de la plasmine (Tsuji et al., 2005). Enfin, de manière contradictoire, le traitement par rt-PA diminue l'expression de MMP-9 au niveau de

la lésion lorsqu'il est administré précocement (20 min) après occlusion de l'artère cérébrale moyenne chez la Souris (Ansar et al., 2014).

Un autre mécanisme pouvant rendre compte des effets du t-PA sur la BHE implique les récepteurs LRP. Au début des années 2000, il a été montré qu'une injection de t-PA intraventriculaire induit une ouverture de la BHE, et que ce mécanisme est bloqué par la protéine RAP, un inhibiteur des LRP (Yepes et al., 2003). De façon intéressante, l'expression endothéliale des LRP augmente rapidement après le début de l'ischémie (Suzuki et al., 2009) et l'interaction avec le (r)t-PA conduit l'ectodomaine des LRP à être excrété de la membrane basale, conduisant au détachement des pieds astrocytaires et augmentant ainsi la perméabilité de la BHE (Polavarapu et al., 2007). De plus, le domaine intracellulaire libre des LRP peut activer le facteur de transcription NF- κ B et la voie de signalisation impliquant Akt au niveau des astrocytes (Zhang et al., 2007), aboutissant à l'augmentation de l'expression et de l'activité des MMP-3 et 9 (Aoki et al., 2002, Lee et al., 2007a). L'activation de NF- κ B va également induire l'expression de l'iNOS (Zhang et al., 2007) dont l'implication dans la rupture de la BHE en conditions ischémiques a été mise en évidence récemment (Mohammadi et al., 2012).

Par ailleurs, le t-PA est capable, *via* son domaine kringle 2 (Fredriksson et al., 2004), d'activer un facteur de croissance plaquettaire appelé PDGF-CC (platelet-derived growth factor-CC), ce qui aboutirait à l'activation du récepteur PDGF- α situé au niveau des astrocytes périvasculaires (Su et al., 2008). Cette activation, jouant un rôle dans la fragilisation de la BHE, est indirecte et semble nécessiter une interaction avec les LRP. En effet, l'application *in vitro* de t-PA sur des cultures de fibroblastes de souris de souche sauvage ou déficientes en LRP, a montré que seules les premières présentent une activation efficace de PDGF-CC (Su et al., 2008). Ainsi, l'activation indirecte de ces récepteurs PDGF- α par le t-PA via les LRP induirait l'ouverture de la BHE.

Le (r)t-PA est également capable de favoriser l'adhérence et la dégranulation des polymorphonucléaires neutrophiles (PMN), qui sont des sources de MMP (Cuadrado et al., 2008), de cytokines et de radicaux libres. A l'heure actuelle, les mécanismes impliqués dans ce phénomène ne sont pas encore connus, mais il a été suggéré que la protéine kinase C serait impliquée dans la libération des granules.

En conclusion, le (r)t-PA serait capable d'activer différentes voies participant à la dégradation de la BHE. Dans le cadre des AVC ischémiques, l'effet du rt-PA sur la fragilisation

de la BHE a des répercussions sur la survenue de lésions parenchymateuses et donc, sur le devenir neurologique des patients. De manière intéressante, la fluoxétine qui posséderait un rôle protecteur dans la rupture de la BHE post-AVC (Lee et al., 2013a) en diminuant significativement l'expression et l'activité de MMP-2 et -9, pourrait être utilisée comme agent protecteur lors du traitement de l'AVC en combinaison avec le rt-PA, mais pour l'heure aucune étude clinique n'a encore étudié les effets d'une telle association.

L'ensemble des mécanismes impliquant le t-PA dans la rupture de la BHE sont représentés schématiquement à l'aide de la figure 17.

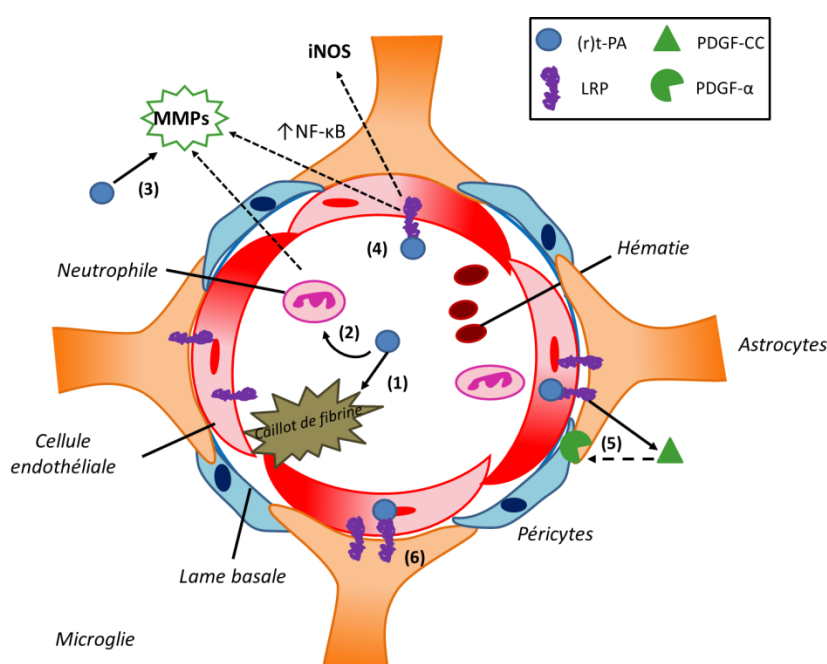


Figure 17 - Schéma récapitulatif des principaux mécanismes moléculaires de la fibrinolyse (1) et de l'implication du (r)t-PA (2-6) dans la fragilisation de la BHE.

- (1) Le (r)t-PA, *via* le clivage du plasminogène en plasmine, va permettre la lyse du caillot de fibrine et la recanalisation du vaisseau.
- (2) Le (r)t-PA favorise l'adhérence et la dégranulation des PMN qui sont des sources de MMPs (Cuadrado *et al.* 2008).
- (3) Le (r)t-PA va activer les MMPs directement (Tsuji *et al.* 2005) ou par l'intermédiaire de la plasmine (Suzuki *et al.* 2010).
- (4) Le (r)t-PA peut interagir avec les récepteurs LRP endothéliaux, activant ainsi NF-κB, ce qui va conduire à la surexpression des MMPs (Aoki *et al.* 2002 ; Lee *et al.* 2007a) et de la iNOS (Zhang *et al.* 2007 ; Mohammadi *et al.* 2012).
- (5) Le (r)t-PA, fixé sur les récepteurs LRP, est capable d'activer PDGF-CC qui va pouvoir interagir avec son récepteur, le PDGF-α, situé sur les astrocytes et les péricytes (Su *et al.* 2008).
- (6) Le (r)t-PA est aussi capable de cliver un fragment des récepteurs LRP, permettant ainsi le détachement des pieds astrocytaires et donc l'ouverture de la BHE (Polavarapu *et al.* 2007).

C. Fonctions centrales du t-PA

Le t-PA remplit diverses fonctions dans le parenchyme cérébral. Il intervient notamment dans la pousse neuritique (Pittman et al., 1989, Seeds et al., 1995), la modulation de la signalisation glutamatergique (Nicole et al., 2001), l'établissement de la LTP (Baranes et al., 1998), ainsi que dans l'activation de la microglie (Siao and Tsirka, 2002).

Le t-PA synthétisé par les neurones est stocké dans des granules de localisation dendritique et axonale. Sa sécrétion se fait par exocytose (Ca^{2+} -dépendant) déclenchée soit par la dépolarisation du neurone soit par l'activation des NMDAR (Lochner et al., 2006). La transcription du gène codant le t-PA est modulée par l'activité neuronale (Shin et al., 2004). Le t-PA est également synthétisé par les cellules gliales (Benchenane et al., 2004).

1. Rôle du t-PA dans la mise en place du réseau synaptique

Au cours du développement, le t-PA est fortement exprimé dans toutes les régions cérébrales, assurant, entre autres, la pousse neuritique au niveau des cônes de croissance à l'origine de la mise en place du réseau synaptique (Krystosek and Seeds, 1981). Le t-PA participe à l'établissement des connexions entre neurones *via* la dégradation locale de la MEC (Pittman et al., 1989, Garcia-Rocha et al., 1994).

Le t-PA participerait également à la migration cellulaire au cours du développement du SNC. En effet, des travaux ont mis en évidence une corrélation entre les niveaux d'expression des ARNm codant le t-PA dans le cervelet et la migration des neurones granulaires (Friedman and Seeds, 1995), processus inhibé par les inhibiteurs de sérines protéases (Moonen et al., 1982) et ralenti chez les souris KO t-PA (Seeds et al., 1999).

Même si les mécanismes impliqués ne sont encore totalement élucidés, le t-PA est capable d'induire, *in vitro* et *in vivo*, la dégradation des protéoglycanes chondroïtine sulfate (PGS) suite à l'activation directe de désintégrines de type 4 et de métalloprotéinases comportant des motifs thrombospondine connus pour leur rôle dans le développement neuronal et dans la formation de la cicatrice gliale (ADAMTS-4) (Lemarchant et al., 2014). Ainsi, en utilisant un modèle de lésion de la moelle épinière chez le Rat, les travaux de Lemarchant ont mis en évidence que l'injection de t-PA ou de ADAMTS-4 en intra-spinal entraînent une diminution des PGS dans la moelle épinière, avec pour conséquence une amélioration de la régénération/pousse axonale.

2. Rôle du t-PA dans la plasticité synaptique

Les premières données en faveur du rôle proplastique du t-PA dans le cerveau adulte ont été apportées par des études rapportant une réduction des processus de LTP chez la souris KO t-PA (Carmeliet et al., 1994, Huang et al., 1996). De manière intéressante, la stimulation synaptique haute fréquence qui induit la LTP conduit à une augmentation rapide de l'expression des ARNm codant le t-PA (Qian et al., 1993) et le t-PA lui-même contribuerait à la phase retardée de la LTP en participant au remodelage des connexions synaptiques (Baranes et al., 1998). Plusieurs mécanismes ont été mis en avant pour expliquer l'influence du t-PA dans les processus de plasticité :

- La fixation au niveau des récepteurs LRP exprimés au niveau neuronal et astrocytaire (Wolf et al., 1992, Bu et al., 1994) qui serait capable d'induire la LTP et d'augmenter l'expression de MMP-9 impliquée dans le remodelage de la MEC, permettant la formation de nouvelles synapses (Baranes et al., 1998, Neuhoff et al., 1999).
- La transformation du proBDNF en BDNFm, nécessaire à l'établissement de la phase tardive de la LTP (Pang et al., 2004).
- L'interaction avec l'Annexine II décrite comme capable de promouvoir la croissance des neurites (Lee et al., 2007b).
- L'interaction du t-PA et du récepteur N-Méthyl-D-aspartate (NMDA) assurant une modulation positive de la signalisation glutamatergique (Nicole et al., 2001, Fernandez-Monreal et al., 2004b, Baron et al., 2010) impliquée dans la LTP (Baranes et al., 1998) (voir paragraphe III-C-5).

L'ensemble de ces mécanismes est récapitulé dans la figure 18.

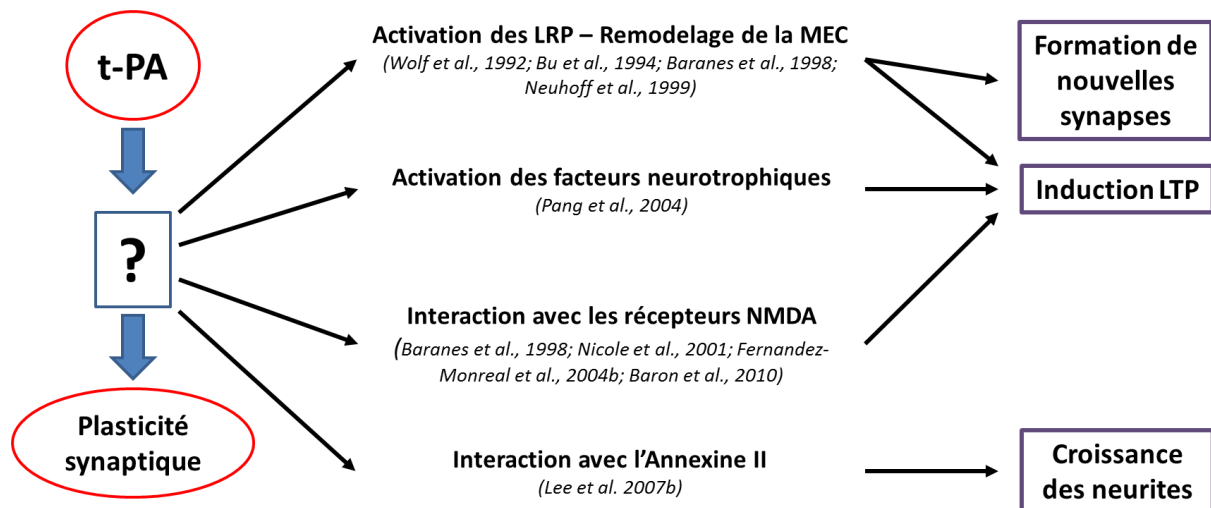


Figure 18 - Principales hypothèses mécanistiques impliquant le t-PA dans la plasticité synaptique.

3. Rôle du t-PA dans la modulation de la signalisation glutamatergique

a) La signalisation glutamatergique

Dans le système nerveux central, le glutamate représente le neurotransmetteur excitateur majeur (70% des neurotransmissions excitatrices au niveau du SNC) (Watkins et al., 1981).

Le glutamate active deux grandes classes de récepteurs : les récepteurs ionotropiques (iGluRs) et les récepteurs métabotropiques (mGluRs). Les premiers sont des récepteurs canaux perméables à un cation et se subdivisent en 3 familles : les récepteurs AMPA, les récepteurs kainate et les récepteurs NMDA (NMDAR). Ces récepteurs sont perméables aux ions Na^+ et K^+ , mais aussi aux ions Ca^{2+} dans le cas des NMDAR (Figure 19).

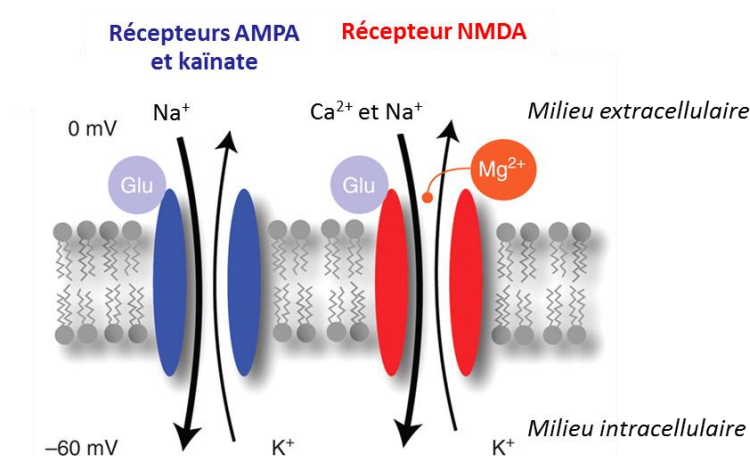


Figure 19- Les récepteurs ionotropiques du Glutamate (d'après Lüscher C. et Malenka R. C. 2004).

Depuis leur découverte au début des années 80, l'étude des NMDAR n'a cessé de s'intensifier en raison de leur rôle central dans le fonctionnement du SNC. Ces récepteurs sont essentiels à la plasticité cérébrale et conduisent à des changements durables des structures et fonctions synaptiques, aboutissant ainsi à un accroissement des fonctions cognitives (Traynelis et al., 2010). En effet, l'influx de calcium à travers les NMDAR est capital pour la synaptogenèse, la plasticité synaptique, la LTP et la LTD.

Cependant, une activation accrue des NMDAR exerce un effet délétère à l'origine du concept d'excitotoxicité qui contribue à la maturation de l'infarctus cérébral en cas d'AVC. De plus, leur dysfonctionnement a été impliqué dans de multiples pathologies neurologiques et psychiatriques (Lau and Zukin, 2007, Mony et al., 2009, Traynelis et al., 2010) entraînant la recherche de nouvelles molécules pouvant agir sur ces récepteurs.

(1) Les sous-unités des NMDAR

Les NMDAR présentent une grande diversité dans la composition moléculaire de leurs sous-unités, leurs propriétés biophysiques et pharmacologiques, leurs modalités d'interactions avec leurs ligands et enfin dans leur localisation subcellulaire (Cull-Candy and Leszkiewicz, 2004, Traynelis et al., 2010, Paoletti, 2011). La composition des sous-unités du récepteur varie au cours du développement et en situation pathologique. De plus, la composition de ces sous-unités peut être modifiée en fonction de l'activité neuronale au niveau des synapses fonctionnelles. Sept sous-unités, appartenant à 3 sous-familles, ont été identifiées :

- Une sous-unité GluN1 encodée par un seul gène et possédant 8 isoformes différentes (GluN1-1-4a et GluN1-1-4b). GluN1 est exprimée dans le SNC de manière ubiquitaire depuis la phase embryonnaire jusqu'à l'âge adulte (Watanabe et al., 1992, Akazawa et al., 1994, Monyer et al., 1994), avec une différence d'expression des isoformes. Au-delà de sa localisation neuronale classique, il a récemment été montré que la sous-unité GluN1 est présente au niveau des cellules endothéliales cérébrales et de leurs jonctions serrées (Reijerkerk et al., 2010).
- Quatre sous-unités GluN2 : GluN2A, GluN2B, GluN2C et GluN2D, encodées par 4 gènes différents. Les 4 isoformes de la sous-unité présentent des profils d'expression spatiotemporels spécifiques (figure 10) (Akazawa et al., 1994, Monyer et al., 1994, Sheng et al., 1994).

- Deux sous-unités GluN3 : GluN3A et GluN3B, encodées par 2 gènes distincts. GluN3A présente un pic d'expression juste après la naissance puis décline progressivement, à l'inverse de GluN3B dont l'expression s'accroît progressivement au cours du développement jusqu'à être fortement exprimée au niveau des motoneurones à l'âge adulte.

Les NMDAR fonctionnent grâce à un assemblage hétérotétramérique de ses sous-unités, associant toujours 2 sous-unités GluN1 aux sous-unités GluN2 ou à un mélange des sous-unités GluN2 et GluN3, pour former des sous-types de récepteurs, respectivement, di-hétéromériques ou tri-hétéromériques (Figure 20) (Cull-Candy and Leszkiewicz, 2004, Traynelis et al., 2010, Paoletti, 2011).



Figure 20 - Assemblage des sous-unités des NMDAR.

La présence précoce des sous-unités GluN2B, GluN2D et GluN3A au sein des NMDAR au cours du développement suggère un rôle important de ces dernières dans la synaptogenèse et la maturation synaptique (Henson et al., 2010, Pachernegg et al., 2012). De plus, la prédominance des sous-unités GluN2A et GluN2B dans des structures telles que l'hippocampe et le cortex, indique que celles-ci pourraient jouer un rôle clé dans le fonctionnement et la plasticité des synapses (Watanabe et al., 1992, Akazawa et al., 1994, Monyer et al., 1994) (Figure 21).

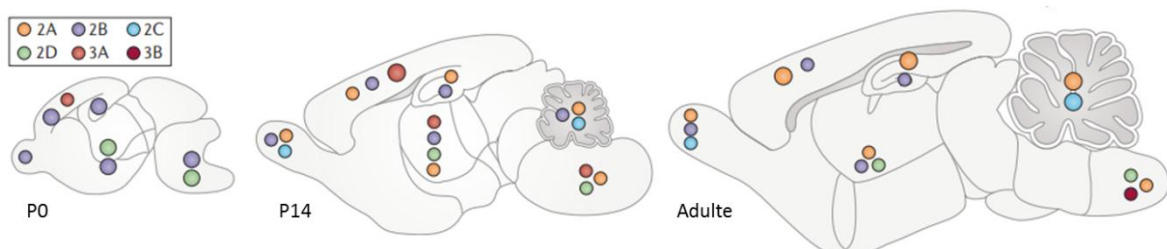


Figure 21- Evolution du profil d'expression des sous-unités GluN des NMDAR dans le cerveau murin au cours du développement, de la naissance à l'âge adulte. D'après Paoletti et al. 2013.

(2) Les sous-types

Comme évoqué précédemment, les sous-types de NMDAR sont caractérisés par la composition de leurs sous-unités. Il existe une variation importante des propriétés de ces sous-types dont chaque sous-unité impacte leurs attributs biophysiques, pharmacologiques et signalétiques. Les sous-types des NMDAR varient en fonction de leur localisation subcellulaire. Généralement, les NMDAR sont retrouvés au niveau post-synaptique. Dans l'encéphale d'un sujet adulte, les récepteurs synaptiques sont majoritairement di-hétéromériques GluN1/GluN2A et tri-hétéromériques GluN1/GluN2A/GluN2B, alors qu'au niveau des sites peri- et extra-synaptiques les récepteurs sont enrichis en sous-unités GluN2B (Hardingham and Bading, 2010, Gladding and Raymond, 2011).

La composition des sous-unités des NMDAR n'est pas statique et change au cours du développement en réponse à l'activité neuronale et au cours d'expériences sensibles. Cette plasticité synaptique existe toujours chez le sujet adulte. Ces changements de sous-unités peuvent être rapides (de l'ordre de la minute), et peuvent profondément impacter le fonctionnement des synapses (Paoletti et al., 2013).

b) Interaction du t-PA avec les récepteurs NMDA

Depuis que les travaux de Carmeliet ont mis en évidence en 1994 que les animaux t-PA^{-/-} présentaient un déficit des processus de LTP, le t-PA est désormais considéré comme un neuromodulateur du système glutamatergique *via* son interaction avec les NMDAR (Carmeliet et al., 1994, Samson and Medcalf, 2006, Montagne et al., 2012).

(1) t-PA et sous-unité GluN1

En 2001, une équipe française a émis l'hypothèse selon laquelle le t-PA est un modulateur positif de la neurotransmission glutamatergique grâce à un mécanisme faisant intervenir le clivage de la sous-unité GluN1 du récepteur NMDA (Nicole et al., 2001). Le t-PA se fixe sur les 2 sous-unités GluN1 composant le récepteur. Le domaine Kringle 2 du t-PA reconnaît une poche hydrophobe du domaine N-terminal de la sous-unité GluN1 et assure ainsi « l'amarrage » du t-PA au récepteur (Lopez-Atalaya et al., 2008). Le t-PA va alors pouvoir présenter son site protéolytique et opérer un clivage au niveau de l'arginine 260 de la deuxième sous-unité GluN1 (Fernandez-Monreal et al., 2004a). Ce clivage, conduit à

l'activation des NMDAR et améliore leur réponse aux stimuli. En conditions ischémiques, ce clivage est responsable de l'effet pro-excitotoxique du t-PA (Nicole et al., 2001, Fernandez-Monreal et al., 2004a).

Selon d'autres auteurs, l'activation des NMDAR par le t-PA serait indépendante du clivage de la sous-unité GluN1, mais nécessiterait la présence et l'activation d'un co-récepteur : le récepteur LRP (Samson et al., 2008). Le t-PA se fixerait d'abord au récepteur LRP et potentialiserait ensuite la signalisation NMDA par un mécanisme faisant intervenir l'interaction du complexe t-PA/LRP avec GluN1 *via* la protéine adaptatrice PSD-95 (Martin et al., 2008).

Un modèle utilisant une stratégie d'immunothérapie a été développé afin d'étudier l'impact de l'interaction t-PA/GluN1 (Benchenane et al., 2007, Macrez et al., 2010). Cette technique consiste à immuniser des souris en leur injectant une forme recombinante du domaine N-terminal de GluN1 qui va déclencher la production d'anticorps reconnaissant le domaine amino-terminal de la sous-unité. Chez ces animaux, le blocage de l'interaction t-PA/GluN1 conduit à une altération des fonctions cognitives, comme par exemple un déficit de la mémoire spatiale et une diminution de la sensibilité des cellules à l'ischémie et à la mort neuronale. Elle permet également l'extension de la fenêtre thérapeutique de la fibrinolyse chez des souris soumises à une ischémie focale thrombo-embolique, en diminuant le caractère excitotoxique du t-PA et donc le volume de lésion (Macrez et al., 2011). Ces résultats tendent à démontrer que l'interaction t-PA/GluN1 est un élément crucial dans les processus physiologiques et pathologiques du système nerveux central. Ces mécanismes sont récapitulés dans la figure 22.

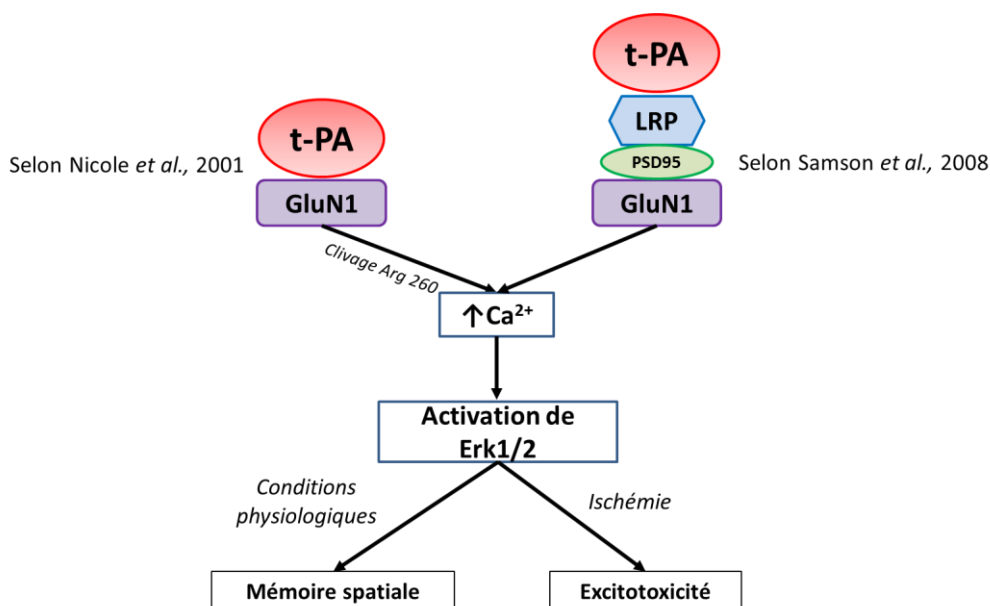


Figure 22 - Schéma représentatif des deux mécanismes impliqués dans l'interaction t-PA/GluN1.

(2) t-PA et sous-unité GluN2B

L'intoxication chronique à l'éthanol est connue pour entraîner une augmentation du nombre de NMDAR, ce qui est à l'origine du risque convulsif lors du sevrage alcoolique (Pawlak et al., 2005). Or, l'accroissement de l'expression de la sous-unité GluN2B dû à l'éthanol est inexistant chez les souris KO t-PA, mettant ainsi en évidence le caractère indispensable du t-PA dans cette régulation. La phosphorylation de la tyrosine-1472 de cette sous-unité par la tyrosine kinase Fyn semble impliquée dans la modulation des propriétés du canal ionique du récepteur et dans la plasticité synaptique (Nakazawa et al., 2001). L'étude de Pawlak a ainsi montré que l'augmentation du taux de phosphorylation de ce site induite par le sevrage alcoolique, n'est pas observée chez les animaux KO t-PA. Ces données suggèrent que le t-PA est capable d'induire l'activation et la phosphorylation des récepteurs contenant GluN2B *via* l'activation de Fyn. De même, il est admis que l'activation des NMDAR contenant une sous-unité GluN2B conduit à la phosphorylation et à l'activation de ERK1/2. Lors du sevrage alcoolique, le taux de phosphorylation de ERK1/2 est significativement augmenté chez les animaux de souche sauvage mais pas chez les KO t-PA. Toutefois, les mécanismes impliqués restent à déterminer avec précision.

L'interaction du t-PA avec GluN2B ne semble pas de nature protéolytique (Pawlak et al., 2005). En effet, des extraits hippocampiques ont été incubés avec du t-PA et aucun clivage de la sous-unité GluN2B et/ou diminution de la forme native n'ont été détectés par

Western blotting. De plus, l'injection de t-PA STOP n'a aucun impact sur la sévérité des convulsions déclenchées par le sevrage alcoolique. Les résultats de Pawlak et *al.* concernant l'action non protéolytique du t-PA sur la GluN2B sont cependant controversés. Il a été en effet rapporté que la sous-unité GluN2B des NMDAR serait également un substrat direct du t-PA dont le site de clivage se trouverait au niveau de la liaison peptidique séparant Arg67 à Val68 (Ng et al., 2012). L'action du t-PA générerait une forme tronquée de la sous-unité conférant au récepteur une sensibilité moindre à la glycine, un co-agoniste du glutamate. Ainsi, selon ces auteurs, le clivage de la sous-unité GluN2B par t-PA pourrait conduire à un hypofonctionnement des NMDAR et constituerait une entrave à la LTP. Cet effet serait donc plus marqué dans le cerveau des animaux jeunes dont l'expression des NMDAR contenant une sous-unité GluN2B est plus élevée (Kew et al., 1998, Liu et al., 2004b). Les différentes hypothèses concernant les mécanismes impliqués dans l'interaction t-PA/GluN2B sont représentées dans la figure 23.

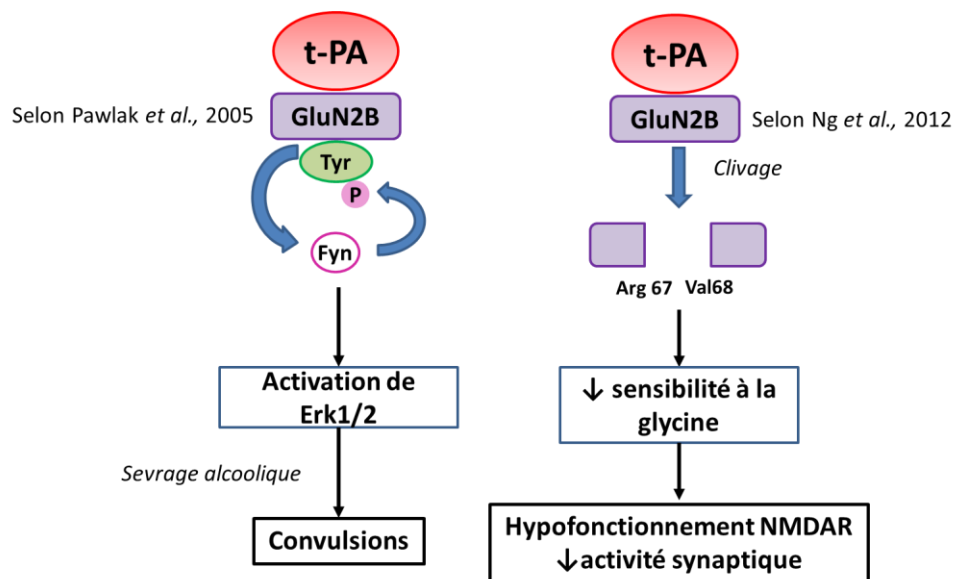


Figure 23 - Schéma représentatif des deux mécanismes impliqués dans l'interaction t-PA/GluN2B.

(3) t-PA et sous-unité GluN2D

La sous-unité GluN2D est surexprimée au niveau des neurones corticaux. Cette sous-unité pourrait contribuer au rôle neuro-excitateur du t-PA (Baron et al., 2010). Dans ce contexte, les antagonistes plus ou moins spécifiques de GluN2D comme le (2R*,3S*)-1-(9-bromophenan-threne-3-carbonyl)piperazine-2,3-dicarboxylic acid (UBP145) et/ou le phenanthrene derivative (2S*, 3R*)-1-(phenanthrene-2-carbonyl)piperazine-2,3-dicarboxylic

acid (PPDA) se sont montrés capables d'annuler l'effet potentialisateur du t-PA sur l'excitotoxicité du glutamate (Baron et al., 2010, Jullienne et al., 2011).

Il est important de noter que les NMDAR contenant une sous-unité GluN2D sont majoritairement extra-synaptiques (Brickley et al., 2003, Harney et al., 2008). Or, l'activation des NMDAR extra-synaptiques ne conduit pas à l'activation de CREB, contrairement à l'activation des NMDAR synaptiques (Hardingham et al., 2002). La stimulation des NMDAR extra-synaptiques entraîne une perte de potentiel membranaire mitochondrial et la mort neuronale. On peut donc penser que la capacité du t-PA à interagir avec cette sous-unité serait à l'origine d'effets délétères. De ce fait, la différence de sensibilité au t-PA en conditions excitotoxiques entre le cortex et l'hippocampe, pourrait en partie s'expliquer par la présence et l'absence respectivement, de NMDAR contenant une sous-unité GluN2D dans ces structures.

Les souris KO GluN2D présentent une diminution de l'activité locomotrice et de la mémoire émotionnelle (Miyamoto et al., 2002, Hagino et al., 2010), mais également un défaut de performance dans les tâches de reconnaissance, reliant ainsi les NMDAR contenant une sous-unité GluN2D à la régulation de la mémoire spatiale. Une étude de 2012 s'est donc intéressée au rôle de l'interaction t-PA/GluN2D dans les phénomènes locomoteurs et de mémoire cités ci-dessus. Pour cela, la technique d'immunisation des souris par injection d'une forme recombinante du domaine N-terminal de GluN1 a été utilisée sur des souris KO GluN2D ou « wild type ». Les résultats ont alors mis en évidence que les lots d'animaux de souche sauvage immunisés présentaient une diminution de la mémoire spatiale contrairement aux lots non immunisés. En revanche, aucune différence n'a été mise en évidence chez les souris KO GluN2D entre les animaux immunisés ou non (Obiang et al., 2012). Ces résultats sont donc en faveur du fait que le déficit comportemental observé chez les souris de souche sauvage tire son origine de l'absence d'interaction entre le t-PA et le complexe GluN1/GluN2D. (Figure 24)

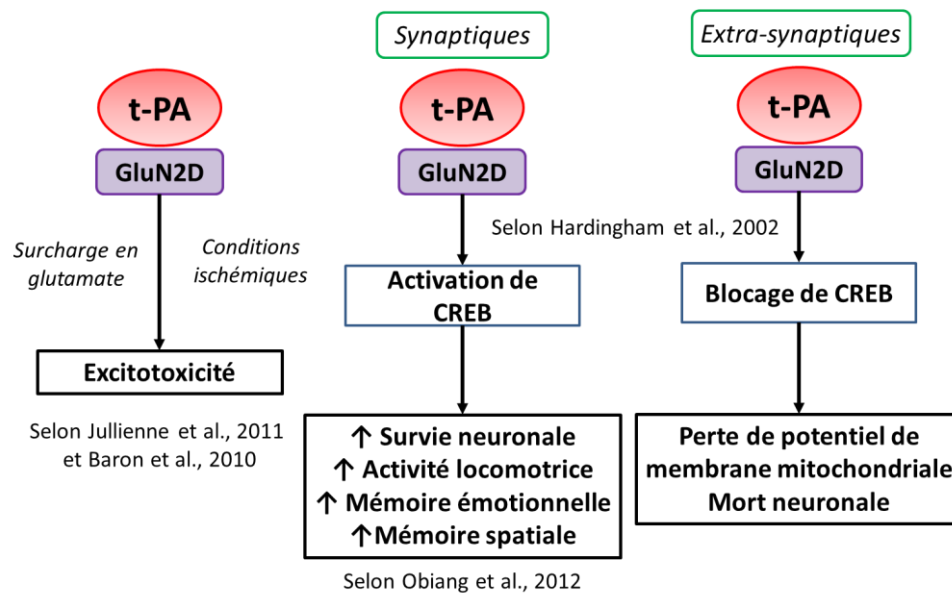


Figure 24 - Schéma représentatif des différents mécanismes impliqués dans l'interaction t-PA/GluN2D.

Pour conclure ce paragraphe, il est important de noter que toutes les formes de t-PA ne semblent pas capables de potentialiser la neurotransmission glutamatergique. En effet, comme évoqué précédemment (III-A-1), le passage de sc-t-PA à tc-t-PA n'influence pas son activité fibrinolytique, mais abolit son effet pro-excitotoxique *in vitro* et *in vivo* (Parcq et al., 2012). Néanmoins, à l'heure actuelle, il n'y a pas de données cliniques sur une meilleure efficacité potentielle du tc-t-PA par rapport au sc-t-PA dans le cadre du traitement des AVC d'origine ischémique, le rt-PA (sous sa forme commerciale Alteplase, ACTILYSE®) étant constitué d'un mélange des deux formes avec plus de 90% de sc-tPA.

4. Rôle du t-PA dans les phénomènes apoptotiques

L'idée que le t-PA puisse induire l'apoptose s'appuie sur la constatation que la neuroserpine diminue le nombre de cellules apoptotiques au niveau de la zone de pénombre des animaux ischémiés (Yepes et al., 2000). Cette observation a donné lieu à de nombreuses études qui ont abouti à des résultats contradictoires, le t-PA ayant été impliqué aussi bien dans des mécanismes anti-apoptotiques que pro-apoptotiques (Flavin et al., 2000, Liu et al., 2004a, Medina et al., 2005, Liot et al., 2006, Lee et al., 2007b).

En effet, le t-PA diminue la mort cellulaire au niveau de l'hippocampe dans un modèle murin de pré-conditionnement ischémique. Ces résultats pourraient être la conséquence de l'activation des NMDAR, de la phosphorylation d'Akt, puis de l'activation du

facteur de transcription CREB (Du and Montminy, 1998) ou d'une augmentation rapide et intense de l'activité t-PA dans l'espace extracellulaire conduisant à l'activation d'un signal cellulaire neuroprotecteur médié par les LRP (Echeverry et al., 2010).

Plusieurs autres hypothèses pourraient expliquer l'effet anti-apoptotique du t-PA. La première réside dans sa capacité à convertir les pro-neurotrophines (proBDNF, proNGF) en leur forme mature active (Pang et al., 2004), la seconde dans l'activation d'un facteur de croissance : l'EGF. Cet effet est à l'origine d'une propriété protectrice du t-PA sur la substance blanche (Correa et al., 2011). Deux mécanismes ont été proposés : (1) le t-PA *via* la plasmine et les MMP-9 cliverait l'EGF lié à l'héparine en EGF libre (Hurtado et al., 2007), (2) le t-PA pourrait se lier au récepteur EGF (EGFR) de manière dépendante (Ortiz-Zapater et al., 2007) ou non dépendante (Correa et al., 2011) de l'Annexine II. De plus, le t-PA est capable de diminuer l'expression des facteurs pro-apoptotiques Bad et Bax, et d'augmenter l'expression des facteurs anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL dans un modèle *in vitro* d'apoptose par déprivation en facteurs trophiques. Ces phénomènes seraient déclenchés par l'activation d'EGFR suivi du recrutement des voies PI3 kinase et Erk1/2. Enfin, une étude récente a montré que chez des souris subissant une MCAO, le traitement par rt-PA diminue l'expression de caspase-3 au niveau de la lésion par rapport aux animaux traités, uniquement lorsqu'il y a reperfusion complète du vaisseau occlus (Ansar et al., 2014).

A notre connaissance, seule une poignée d'études ont mis en évidence un rôle pro-apoptotique du t-PA. Une étude de 2000 a montré que le milieu de culture de cellules microgliales exposées à du LPS est capable d'induire l'apoptose d'une culture de neurones hippocampiques (Flavin et al., 2000). Or, ce phénomène est inhibé si le milieu est supplémenté en PAI-1, t-PA STOP ou au moyen d'anticorps anti-t-PA. Le t-PA est également capable d'augmenter la mort par apoptose au niveau de l'endothélium cérébral en conditions ischémiques et au niveau des neurones en conditions excitotoxiques (suractivation des NMDAR), par un processus impliquant les caspases 8 et 3 (Liu et al., 2004a). Cette même étude a montré *in vitro* et *in vivo* qu'en conditions ischémiques, le t-PA serait capable de déplacer l'apoptose de la voie intrinsèque vers la voie extrinsèque. Une autre étude a mis en évidence sur des cultures primaires de neurones que le t-PA est capable d'activer Erk1/2 *via* les NMDAR (Medina et al., 2005). L'activation de Erk1/2 par le t-PA entraînerait l'activation de la glycogène synthase kinase 3 (GSK3), aboutissant à une

phosphorylation anormale de la protéine tau et conduisant à une déstabilisation des microtubules et à l'apoptose des neurones.

5. Rôle du t-PA dans les phénomènes inflammatoires

Le t-PA serait capable de favoriser la migration des macrophages au niveau des sites axonaux de démyélinisation et de promouvoir la diapédèse des monocytes dans la sclérose en plaques (Ling et al., 2006, Reijerkerk et al., 2010). Il serait également impliqué dans des processus neuro-inflammatoires. Par exemple, le t-PA augmente le chimiotactisme de la microglie en conditions excitotoxiques *via* l'activation de la chémokine MCP-1 par clivage protéolytique dépendant de la plasmine (Sheehan et al., 2007). De nombreux effets délétères du t-PA pourraient découler de sa capacité à activer la microglie. En effet, indépendamment de son action fibrinolytique, le t-PA peut activer la microglie grâce à sa fixation au LRP (Zhang et al., 2009) et/ou à l'Annexine II (Siao and Tsirka, 2002). De plus, les cellules microgliales sont une source de t-PA, et une déficience en cette sérine protéase diminue l'activation de la microglie par les stimuli classiques, suggérant ainsi que le t-PA agit sur la microglie de manière autocrine (Rogove et al., 1999). Par ailleurs, la présence de NMDAR fonctionnels au niveau de cellules microgliales murines et humaines a été mise en évidence *in vitro* (Kaindl et al., 2012). La stimulation de ces récepteurs serait responsable de l'activation de la microglie et de la sécrétion de facteurs excitotoxiques impliqués dans la mort des neurones corticaux. De plus, le blocage *in vivo* de la sous-unité GluN1 protège de la mort neuronale par excitotoxicité. Ainsi, le t-PA pourrait *via* l'activation de la sous-unité GluN1 des NMDAR microgliaux être à l'origine de phénomènes inflammatoires.

Après une lésion de la moelle épinière, les animaux KO t-PA présentent une meilleure récupération fonctionnelle que les animaux de souches sauvages (Abe et al., 2003), suggérant un rôle délétère du t-PA. Cet effet a été attribué à au moins 2 mécanismes certainement associés, (i) le t-PA permet l'activation de la microglie/macrophages conduisant à des processus pro-inflammatoires délétères, et/ou (ii) le t-PA peut être sécrété par la microglie activée et conduire à l'apoptose des neurones. Pour tenter d'intégrer ces données liant l'activation de la microglie par le t-PA à la mort neuronale, le modèle suivant a été proposé : les neurones lésés sécrètent du t-PA, qui par un mécanisme cytokine-like (donc non protéolytique) et par son interaction avec les NMDAR microgliaux, va induire l'activation de la microglie dans les tissus endommagés. Cette dernière va alors produire à son tour du t-

PA et d'autres facteurs potentiellement délétères, exacerbant ainsi ses effets neurotoxiques (Siao et al., 2003). Ce mécanisme pourrait expliquer l'implication du t-PA dans les processus neurodégénératifs et neuro-inflammatoires.

La figure suivante récapitule les différentes cibles du t-PA et les conséquences de ses interactions (Figure 25).

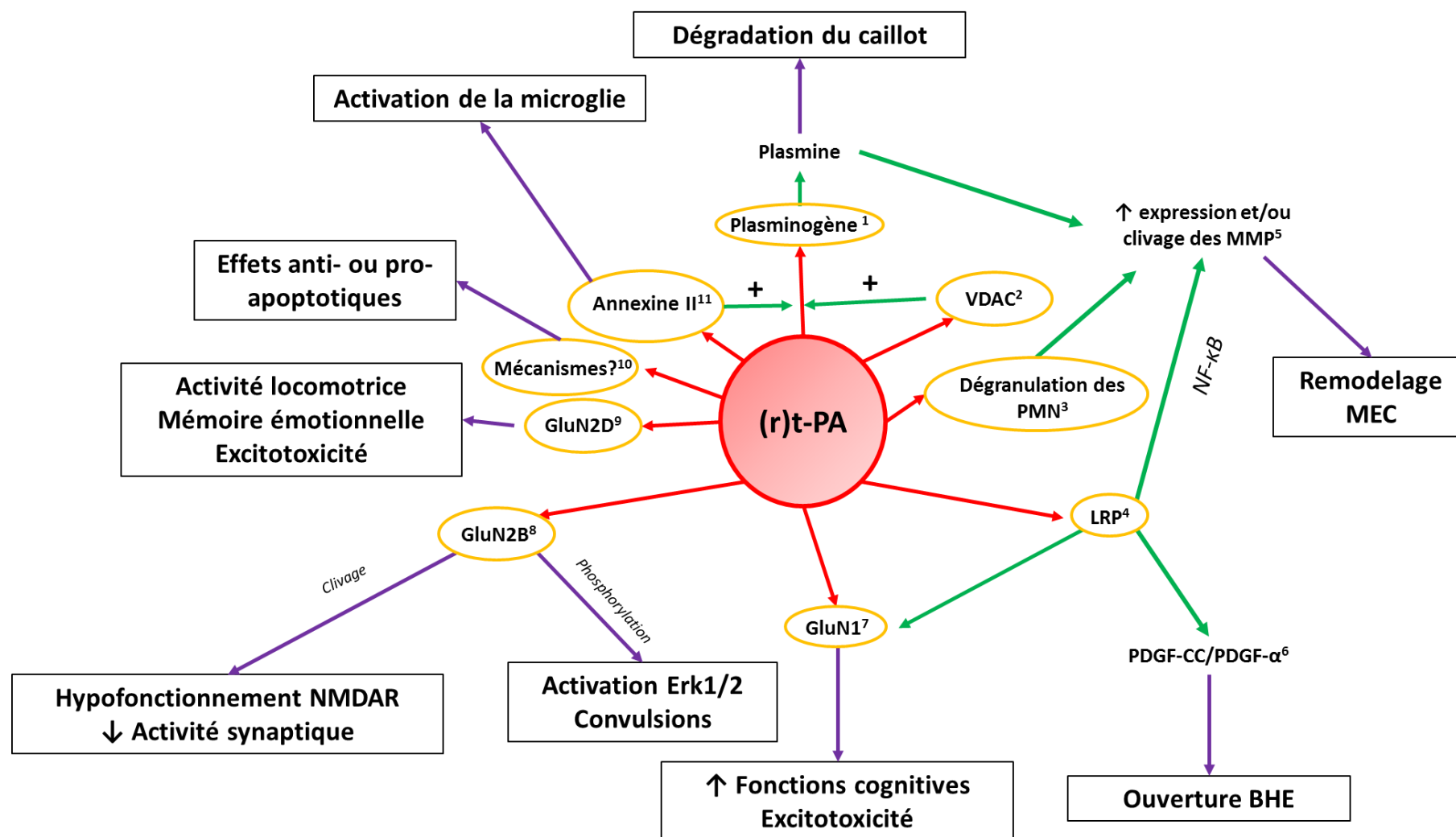


Figure 25 - Schéma récapitulatif des différentes cibles du t-PA et des conséquences de ses interactions.

¹ Rijken et Sakharov, 2001

² Gonzalez-Gronow *et al.*, 2013

³ Cuadrado *et al.*, 2008

⁴ Orth *et al.*, 1994; Aoki *et al.*, 2002 ; Benchenane *et al.*, 2005 ; Lee *et al.*, 2007c

⁵ Aoki *et al.*, 2002 ; Wang *et al.*, 2003 ; ; Lee *et al.*, 2007c Suzuki *et al.*, 2009

⁶ Su *et al.* 2008

⁷ Nicole *et al.*, 2001 ; Fernandez-Monreal *et al.*, 2004 ; Samson *et al.*, 2008 ; Martin *et al.*, 2008

⁸ Pawlak *et al.*, 2005 ; Ng *et al.*, 2012

⁹ Baron *et al.*, 2010 ; Montagne *et al.*, 2011 ; Obiang *et al.*, 2012

¹⁰ Falvin *et al.*, 2001 ; Liu *et al.*, 2004a ; Medina *et al.*, 2005 ; Liot *et al.*, 2006 ; Lee *et al.*, 2007b

¹¹ Kan *et al.*, 1999 ; Siao et Tsirka *et al.*, 2002

D. Utilisation du t-PA en thérapeutique

Le rt-PA est approuvé pour le traitement de l'infarctus aigu du myocarde depuis 1987 et pour l'embolie pulmonaire massive aiguë depuis 1990 (Acheampong and Ford, 2012). Pour ce qui est de l'ischémie cérébrale, différents essais cliniques ont permis d'évaluer l'efficacité de la fibrinolyse par le rt-PA.

1. Etudes cliniques

En 1995 a lieu le premier essai clinique : l'étude NINDS (National Institute of Neurological Disorders and Stroke). C'est un essai randomisé en double aveugle qui a comparé l'effet du rt-PA au placebo à 24h puis à 3 mois. La dose de rt-PA était de 0,9 mg/kg, dont 10% en bolus suivi d'une perfusion de 60 min, la dose maximale étant de 90 mg. Le rt-PA a été administré dans les 3h qui ont suivi l'apparition des signes cliniques. Bien que les résultats à 24h n'aient pas mis en évidence d'effet bénéfique du rt-PA par rapport au placebo, les résultats à 3 mois ont montré que le rt-PA augmentait significativement le pourcentage de patients autonomes (NINDS study group, 1995). Ces résultats ont donc conduit la FDA (Food and Drugs Administration) à autoriser aux Etats-Unis, en 1996, l'utilisation du rt-PA dans l'ischémie cérébrale avec une fenêtre thérapeutique de 3h.

En Europe, l'étude ECASS I (European Cooperative Acute Stroke Study) a été réalisée en parallèle à l'étude NINDS. La dose de rt-PA était plus élevée (1,1 mg/kg) et la fenêtre thérapeutique étendue à 6h. Cette étude a abouti à des résultats négatifs avec une surmortalité à 3 mois dans le groupe traité par le rt-PA (Hacke et al., 1995). Une deuxième étude (ECASS II) avec une fenêtre thérapeutique identique (6h) mais une posologie de traitement à 0,9 mg/kg, n'a montré à 3 mois ni effet bénéfique ni surmortalité. Malgré ces résultats peu encourageants, les investigateurs concluent que le traitement par l'Alteplase à la dose 0,9 mg/kg utilisée chez des patients sélectionnés pourrait conduire à une amélioration significative des séquelles de l'AVC (Hacke et al., 1998).

Au vu de ces données, l'Agence Européenne du Médicament (EMA) approuve toutefois l'utilisation du rt-PA en 2002, mais dans une fenêtre thérapeutique de 3h après l'ischémie cérébrale, avec néanmoins deux conditions : la mise en place de l'étude de suivi SITS-MOST (Safe Implementation of Thrombolysis in Stroke-Monitoring Study) et l'initiation d'un nouvel essai clinique randomisé (ECASS III).

L'étude SITS-MOST avait pour but d'évaluer le profil de sécurité d'utilisation du rt-PA dans une fenêtre thérapeutique de 3h. Cette étude a recruté 6483 patients ayant eu une fibrinolyse dans les 3h suivant le début des symptômes, dans 285 centres et 14 pays, de 2002 à 2006. Les résultats de l'étude ont montré que le nombre de patients présentant un état neurologique favorable, l'incidence des transformations hémorragiques (TH) et la mortalité à 3 mois étaient comparables à ceux des cohortes de NINDS (Wahlgren et al., 2007), et a donc confirmé l'efficacité et la sécurité du rt-PA.

L'essai clinique randomisé ECASS III a eu pour objectif d'évaluer l'efficacité et la sécurité d'utilisation du rt-PA avec une fenêtre thérapeutique étendue au-delà de 3h. Cet essai a été réalisé entre 2003 et 2007, et a inclus 821 patients traités soit par rt-PA à la dose de 0,9 mg/kg soit par placebo dans un délai d'administration de 3h à 4h30. Le nombre de patients présentant un état neurologique favorable à 3 mois a été significativement augmenté par le rt-PA par rapport au placebo (52,4% versus 45,2%) (Hacke et al., 2008). Cette étude a donc permis d'étendre la fenêtre thérapeutique du rt-PA à 4h30.

Enfin, une méta-analyse de six essais cliniques a été réalisée afin d'évaluer l'efficacité du rt-PA jusqu'à 6h : NINDS parties 1 et 2, ECASS I et II et ATLANTIS parties A et B (Hacke et al., 2004). Cette analyse a montré que le rt-PA exerce toujours un effet bénéfique quand il est administré entre 3h et 4h30 après le début des symptômes mais pas au-delà.

L'autorisation de mise sur le marché (AMM) pour le traitement de l'AVC ischémique avec une fenêtre thérapeutique de 3 h a été obtenue en France en 2003. L'autorisation pour un élargissement de la fenêtre thérapeutique à 4h30 a été validée récemment (février 2012). Bien que la fenêtre thérapeutique ait été élargie, il est important de noter que le traitement est d'autant plus efficace qu'il est administré tôt après le début des signes cliniques (Hacke et al., 2004).

2. Conditions d'utilisation du rt-PA

Le but du traitement par le rt-PA est de lyser le caillot sanguin fibrineux et donc de recanaliser le vaisseau occlus. Cependant, la restauration du débit sanguin n'est utile que si le tissu ischémié est encore viable. Il est donc important que l'étendue de la zone de pénombre soit suffisamment importante avant d'instaurer le traitement (Donnan et al., 2009). L'étude DEFUSE (Diffusion-weighted imaging Evaluation For Understanding Stroke Evolution), rassemblant 74 patients ayant eu une IRM entre 3 et 6h après le début de

l'ischémie a montré que 54 % des patients présentent un décalage entre la séquence de perfusion et la séquence de diffusion, ce qui indique la présence d'une pénombre potentiellement traitable (Albers et al., 2006). Malheureusement, en raison de sa fenêtre thérapeutique courte et de nombreuses contre-indications, moins de 5% des patients victimes d'un AVC sont fibrinolyés par le rt-PA (Cronin, 2010).

En raison de sa demi-vie plasmatique très courte, le protocole d'utilisation du rt-PA dans le traitement de l'AVC ischémique est particulier. En effet, l'injection débute par un bolus sur 1 min représentant 10 % de la dose à administrer qui va avoir pour objectif de saturer les inhibiteurs du (r)t-PA ainsi que les récepteurs de clairance, puis elle se poursuit par une perfusion lente sur une heure qui permettra la dégradation du caillot. La posologie du rt-PA est de 0,9 mg/kg.

3. Effets indésirables du rt-PA

Les effets pléiotropes du rt-PA participent à sa toxicité vasculaire (transformations hémorragiques (TH)) de par ses interactions avec le PDGF-CC (Su et al., 2008), l'Annexine II (Siao and Tsirka, 2002) et les LRP (Zhang et al., 2007) ainsi qu'à sa toxicité neuronale (excitotoxicité) de par son interaction avec le NMDAR (Nicole et al., 2001, Kaur et al., 2004, Adibhatla and Hatcher, 2008, Yepes et al., 2009, Jin et al., 2010),.

De par ses interactions avec ses différentes cibles, le rt-PA présente un risque hémorragique. L'étude NINDS rapporte un taux de TH symptomatiques de 6,4% pour les patients traités par rt-PA contre 0,6% sous placebo (Group, 1995). Cette augmentation des TH symptomatiques a été confirmée par d'autres études : 7% versus 1,1% pour l'étude ATLANTIS (Clark et al., 1999) et 8,8% versus 3,4% pour l'essai ECASS II (Hacke et al., 1998). Très récemment, une méta-analyse rassemblant 12 essais cliniques a montré que le rt-PA augmente le risque de TH symptomatiques de 7,7% versus 1,8% avec une augmentation de mortalité dans les 7 jours post-AVC (8,9% versus 6,4%) sans modification de la mortalité en fin d'étude (Wardlaw et al., 2012).

L'incidence des TH est liée à différents facteurs cliniques (délai d'administration du rt-PA, âge, hypertension artérielle, hyperglycémie ou sévérité de l'ischémie cérébrale), à différents facteurs biologiques (exemple : activation des MMPs) et enfin à des signes visibles

en imagerie comme la rupture de la BHE ou la présence de microhémorragies sur l'IRM (Lansberg et al., 2007, Derex and Nighoghossian, 2008).

E. A la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques

1. Les nouveaux agents fibrinolytiques

Devant les effets potentiellement toxiques du rt-PA, différents agents dérivés du t-PA ont été développés au cours des 20 dernières années (reteplase, alteplase, pamiteplase, lanoteplase, aliminateplase) mais leur intérêt clinique dans l'AVC est décevant (Medcalf and Davis, 2012). Seul le tenecteplase, une forme modifiée du t-PA, a montré une meilleure affinité pour la fibrine ainsi qu'une demi-vie plasmatique étendue par rapport au rt-PA (25 min vs 5 min). En 2005, les travaux de Haley mettent en évidence que le tenecteplase à la dose de 0,4 mg/kg en bolus i.v. peut être administré sans risque dans le traitement de la phase aiguë de l'AVC. De manière intéressante, une étude pilote a comparé l'efficacité de 0,1 mg/kg de tenecteplase en i.v. administré entre 3 et 6h après le début de l'AVC *versus* 0,9 mg/kg de rt-PA en i.v. administré dans les 3h (Parsons et al., 2009). Le tenecteplase conduit à une meilleure recanalisation, une meilleure reperfusion, et à une amélioration du score NIHSS à 24h, et ce, en toute innocuité (Parsons et al., 2009, Lyden, 2011). Ces données ont été confirmées par un essai clinique au sein duquel les patients ont été traités dans les 6h suivants l'apparition des symptômes (Parsons et al., 2012). A la dose de 0,25 mg/kg, le tenecteplase s'est montré supérieur au rt-PA 0,9 mg/kg en terme d'efficacité à 24h et à 90 jours, sans différences notables concernant de possibles hémorragies et autres paramètres de sécurité. Ainsi, un essai clinique de phase III (TASTE) est actuellement prévu afin de comparer le tenecteplase et le rt-PA dans une fenêtre thérapeutique de 4h30.

Depuis 1932, la salive de la chauve-souris vampire *Desmodus rotundus* est connue pour interférer avec les mécanismes hémostatiques. Il faudra attendre 1991 pour que l'un des quatre activateurs du plasminogène présents dans la salive de ce mammifère soit disponible sous une forme recombinante, le desmoteplase (Kratzschmar et al., 1991). Il présente une très grande spécificité pour la fibrine (son activité est multipliée par 105 000 en présence de fibrine) et aucune neurotoxicité (absence de domaine Kringle 2) rendant son utilisation intéressante dans le traitement de l'AVC. Les preuves de son efficacité et de son innocuité ont été fournies par les études DEDAS (Dose Escalation Study of Desmoteplase in

Acute ischemic Stroke) et DIAS (Desmoteplase in Acute Ischemic Stroke) réalisées en 2005 (Hacke et al., 2005, Furlan et al., 2006). Une étude *post-hoc* (DIAS-2) a mis en évidence un effet bénéfique du desmoteplase supérieur chez les patients présentant une sténose sévère ou une occlusion d'un vaisseau cérébral, par rapport aux patients présentant une sténose modérée ou une absence de sténose (Fiebach et al., 2012). Ces résultats ont ainsi fourni une base pour la conception de deux essais cliniques actuellement en cours (DIAS-3 et DIAS-4), dont l'objectif est d'étudier l'efficacité et l'innocuité d'une injection unique de 90 µg/kg de desmoteplase en bolus i.v. entre 3 et 9h après le début des signes cliniques de l'AVC.

2. Association d'agents pharmacologiques au rt-PA

Au cours des études pré-cliniques et cliniques de nombreuses molécules ont été associées au rt-PA afin d'augmenter l'efficacité et l'innocuité de la fibrinolyse.

a) Les statines

Dans les maladies cardiovasculaires et l'ischémie cérébrale, les statines exercent des effets protecteurs vasculaires puissants en améliorant notamment la fonction endothéliale, en inhibant la cascade inflammatoire et de coagulation, et en augmentant la synthèse de NO. Elles ont également des propriétés anti-oxydantes et immunomodulatrices (Takemoto and Liao, 2001, Mooradian et al., 2005, Sacco and Liao, 2005). Dans des modèles de rats embolisés, l'association rt-PA/atorvastatine présentent des effets neuroprotecteurs associés à une amélioration de l'intégrité des vaisseaux cérébraux (Zhang et al., 2005, Zhang et al., 2012). En effet, l'atorvastatine empêche la potentialisation de la rupture de la BHE par le rt-PA en diminuant l'expression endothéliale de MMP-2 et -9 (Zacco et al., 2003). De même, la simvastatine est capable, dans une culture d'astrocytes corticaux, de supprimer la surexpression de MMP-9 induite par le t-PA, en inhibant la voie de la kinase Rho (Wang et al., 2006). Les statines se sont également montrées capables de protéger les neurones contre la mort due à l'excitotoxicité induite par l'activation des NMDAR (Zacco et al., 2003). Cette protection s'exercerait selon les auteurs par une diminution de la composition en cholestérol des cellules modifiant la dynamique membranaire réduisant ainsi l'excitabilité des NMDAR. Enfin, une étude rétrospective récente a montré que le traitement par statines débuté dans les 24h après la fibrinolyse améliore l'état de santé des patients sur le plan fonctionnel (Cappellari et al., 2011).

b) Les agents glutamatergiques

La potentialisation de la signalisation glutamatergique par le (r)t-PA étant à l'origine de ses effets excitotoxiques en conditions ischémiques, les antagonistes des récepteurs au glutamate représentent donc une cible pertinente dans la neuroprotection. Dans ce contexte, le MK801 ou dizocilpine a été abondamment étudié comme molécule neuroprotectrice dans le cadre du traitement de l'ischémie cérébrale chez l'animal (Ginsberg, 1993). Il réduit significativement les volumes de lésions lorsqu'il est administré avant l'ischémie ou 1 à 2 heures après. Néanmoins, lors des premiers tests cliniques, les essais furent arrêtés lors des phases pilotes suite à des effets neuropsychologiques indésirables (Hoyte et al., 2004, Muir, 2006). Les espoirs se tournent désormais vers la mémantine, un antagoniste non compétitif des NMDAR, possédant actuellement une AMM dans le traitement de la maladie d'Alzheimer. De manière intéressante, la mémantine agirait préférentiellement sur les NMDAR contenant une sous-unité GluN2D (Kotermanski and Johnson, 2009), qui est, comme évoqué dans les paragraphes précédents, un acteur important de la neurotoxicité du rt-PA (Baron et al., 2010, Jullienne et al., 2011). Les études pré-cliniques réalisées chez le rongeur suggèrent que la mémantine pourrait présenter des effets neuroprotecteurs en conditions ischémiques (Lapchak, 2006), et permettrait d'augmenter l'innocuité de la fibrinolyse par rt-PA (Montagne et al., 2012).

c) Les inhibiteurs du protéasome

Ils ont pour cible la voie ubiquitine-protéasome et ont montré des bénéfices significatifs dans le traitement de l'AVC. Deux agents ont été étudiés chez l'animal, le bortezomib VELCADE® et le PS-519 ou MLN519 (Adams et al., 1999, Kane et al., 2003). Ces molécules ont montré qu'elles sont capables de supprimer efficacement la cascade immuno-inflammatoire en inhibant l'activation de NF- κ B (Vanderlugt et al., 2000). De plus, elles augmentent l'expression de la eNOS, une enzyme importante dans le maintien de la vasodilatation et dans les phénomènes antithrombotiques (Huang et al., 1995, Stangl and Stangl, 2010). En outre, ces inhibiteurs induisent l'expression d'enzymes anti-oxydantes au niveau des neurones, des astrocytes et des cellules endothéliales (Huang et al., 1995, Chen and Regan, 2005, Yamamoto et al., 2007, Lorenz et al., 2009, Dreger et al., 2010). Dans un modèle de rats embolisés, il a été montré que l'association PS-519/rt-PA administrée 2h, 4h

ou 6h après l'embolisation réduit l'infarctus cérébral sans augmenter le risque de TH (Zhang et al., 2001). De même, l'association bortezomib/rt-PA semble améliorer la perméabilité et l'intégrité vasculaire, étendant ainsi la fenêtre thérapeutique d'administration jusqu'à 6h sans augmentation du risque hémorragique (Zhang et al., 2006). Enfin, de manière intéressante, les effets bénéfiques de l'association bortezomib/rt-PA dans le traitement de l'AVC sont retrouvés dans les modèles de rats âgés (Zhang et al., 2010).

d) La minocycline

En plus de ses propriétés anti-inflammatoires, anti-apoptotiques et anti-oxydantes bien connues, la minocycline exerce également des effets protecteurs au niveau vasculaire en supprimant l'activation des MMPs induite par l'AVC (Koistinaho et al., 2005, Machado et al., 2006, Yenari et al., 2006). En effet, l'administration adjuvante de minocycline au traitement par rt-PA inhibe l'augmentation des taux plasmatiques de MMP-9 induite par la sérine protéase et le risque hémorragique associé, étendant ainsi la fenêtre thérapeutique du rt-PA à 6h chez les rats embolisés (Murata et al., 2008). Chez l'Homme, le traitement par minocycline dans les 24h suivant l'AVC est associé à une meilleure évolution clinique (Lampl et al., 2007). De plus, la minocycline est désormais reconnue comme un inhibiteur de PARP (Alano et al., 2006). Ainsi, une étude de 2013 a mis en évidence que l'association de PJ34 (un inhibiteur de PARP) au traitement par rt-PA chez des souris ayant subi une MCAO, possède un effet protecteur en diminuant la destruction des jonctions serrées et l'expression des protéines d'adhésion, réduisant ainsi le risque de TH et améliorant les performances sensorimotrices des animaux (Teng et al., 2013). Les mécanismes impliqués ne sont pas encore élucidés, mais pourraient mettre en jeu les MMP-3.

e) Les « nettoyeurs » de radicaux libres

Plusieurs antioxydants sont en essais cliniques. Bien que des résultats prometteurs aient été obtenus avec le NXY-059 (disodium 2,4- disulfophenyl-N-tert-butyl-nitrone) au cours de l'étude SAINT-I (Stroke-Acute Ischemic NXY Treatment trial) dans laquelle cet antioxydant diminue les TH induites par le rt-PA, la compilation des données des études SAINT-I et SAINT-II n'ont pas mis en évidence d'effets bénéfiques de l'association NXY-059 - rt-PA (Diener et al., 2008). La sécurité de l'association d'un autre antioxydant, l'acide urique, au rt-PA a été mise en évidence dans un essai de Phase II (Amaro et al., 2007). Un essai de

Phase III, l'étude URICO-ICTUS est en cours afin de confirmer l'efficacité de cette association (Amaro et al., 2010). Très récemment, une étude a montré que l'association au rt-PA d'un autre anti-oxydant, l'Edaravone, augmente le taux de recanalisation et améliore les déficits neurologiques des patients (Kono et al., 2013).

f) Autres molécules

Expérimentalement, bien d'autres molécules ont été étudiées. On peut citer notamment, l'Erythropoïétine, qui a présenté sur les modèles animaux des effets protecteurs vis-à-vis de la rupture de la BHE, des effets anti-apoptotiques et anti-oxydant, ainsi que des effets anti-inflammatoires. Malheureusement, ces effets protecteurs n'ont pas été retrouvés chez l'Homme (Siren et al., 2001, Wang et al., 2007b, Ehrenreich et al., 2009). On retiendra également les inhibiteurs de MMPs, la protéine C activée, la mélatonine, EEIIM (un hexapeptide correspondant aux acides aminés 350-355 du PAI-1), le cromoglycate (un stabilisateur de dégranulation mastocytaire) et la neuroserpine (Vivien et al., 2011, Zhang et al., 2012).

Le tableau 6 réunit les différentes molécules proposées comme adjuvants au rt-PA.

Tableau 6- Tableau récapitulatif des différents agents pharmacologiques pouvant être associés au rt-PA dans le but de diminuer sa toxicité.

Molécules	Effets	Références
Statines	↑ intégrité vasculaire ↓ MMP-2 et -9 ↓ rupture BHE ↓ excitotoxicité	Zacco et al., 2003 ; Zhang et al., 2005 ; Zhang et al., 2012
Antagonistes glutamatergiques	Neuroprotection en cas d'ischémie ↓ excitotoxicité ↑ innocuité de la fibrinolyse	Ginsberg et al., 1993 ; Lapchak et al., 2006 ; Montagne et al., 2012
Les inhibiteurs du protéasome	Inhibition NF-κB ↑ NOS endothéliale ↑ enzymes anti-oxydantes ↓ volume d'infarctus ↑ intégrité vasculaire ↑ fenêtre thérapeutique	Huang et al., 1995 ; Vanderlugt et al., 2000; Zhang et al., 2001,2006 ; Chen and Regan, 2005 ; Yamamoto et al., 2007 ; Lorenz et al., 2009 ; Stangl and Stangl, 2010 ; Dreger et al., 2010
Minocycline	Anti-inflammatoire Antiapoptotique Anti-oxydant Inhibition de l'activation des MMPs ↓ risque hémorragique ↑ fenêtre thérapeutique ↑ évolution clinique	Koistinaho et al., 2005; Yenari et al., 2006; Machado et al., 2006; Lampl et al., 2007; Murata et al., 2008
Edaravone	Anti-oxydant ↑ taux de recanalisation ↓ déficit neurologique	Kono et al., 2013
Autres	Anti-oxydant Anti-apoptotique ↓ MMPs Inhibition directe du rt-PA ↓ dégranulation PMN	Vivien et al., 2011; Zhang et al., 2012

F. t-PA et BDNF

Ce n'est que récemment que le lien entre t-PA et BDNF a été mis en évidence. En effet, le système plasminogène/t-PA/plasmine est désormais connu pour être impliqué *in vitro* dans la conversion du pro-BDNF en BDNF mature (Pang et al., 2004, Nagappan et al., 2009).

En 2004, l'équipe de Pang émet l'hypothèse qu'une des fonctions majeure du système t-PA/plasmine est de convertir le proBDNF en BDNFm et que cette conversion est cruciale pour le maintien de la LTP (Pang et al., 2004). Ils ont ainsi mis en évidence que les souris BDNF^{+/-}, t-PA^{-/-} et plasminogène^{-/-} présentent une détérioration de la LTP qui est corrigée par l'application de BDNFm mais pas de proBDNF. Cette même étude s'est ensuite appliquée à déterminer qui du t-PA et de la plasmine était directement impliqué dans le

clivage du proBDNF. Pour se faire, un premier test *in vitro* a été réalisé, utilisant du proBDNF incubé en présence de t-PA, de plasmine, de plasminogène ou d'un mélange t-PA/plasminogène. Seuls les milieux contenant la plasmine ou le mélange t-PA/plasminogène présentaient un clivage du proBDNF en BDNFm. *In vivo*, cette même étude met en évidence des expressions de pro-BDNF significativement plus élevées dans l'hippocampe des animaux t-PA^{-/-} par rapport aux animaux de souche sauvage (Pang et al., 2004). Enfin, cette étude a cherché à déterminer la relation existante entre t-PA, plasmine, BDNFm et LTP. Comme précisé dans les paragraphes précédents, l'expression et la sécrétion du t-PA par les neurones hippocampiques sont régulés par l'activité neuronale (Gualandris et al., 1996, Baranes et al., 1998). L'équipe de Pang montre la capacité du t-PA, de la plasmine et du BDNFm à restaurer la LTP chez les animaux t-PA^{-/-}. En revanche le t-PA est incapable de restaurer la LTP chez les animaux plasminogène^{-/-} et BDNF^{+/-}. De même, la plasmine n'exerce aucun effet sur les animaux BDNF^{+/-}. De ce fait, cette étude a conclu que le t-PA *via* le clivage du plasminogène en plasmine permet la conversion du proBDNF en BDNFm favorisant ainsi la LTP.

En 2009, Nagappan *et al.* se sont intéressés au contrôle du clivage du proBDNF lors des variations d'activité neuronale. La stimulation basse fréquence (LFS) appliquée *in vitro* sur des neurones de souche sauvage conduit à une augmentation de l'expression du proBDNF à la surface des neurones tandis que la stimulation haute fréquence (HFS) conduit à une augmentation de l'expression du BDNFm. De manière intéressante, cette différence n'est pas retrouvée dans les neurones issus d'animaux t-PA^{-/-}. En d'autres termes, les neurones dérivés de souris KO t-PA subissant une HFS seront le siège d'une augmentation à leur surface de l'expression du proBDNF et non du BDNFm. Ces données semblent mettre en évidence l'importance du t-PA dans la conversion du pro-BDNF en BDNFm. Ces résultats supportent également l'hypothèse selon laquelle la sécrétion neuronale de proBDNF est déclenchée par la LFS et la HFS, mais que seule la HFS permet la conversion du proBDNF en BDNFm. Nagappan *et al.* apportent alors la confirmation de cette hypothèse en montrant que l'inhibition intracellulaire de la conversion du proBDNF en BDNFm par un inhibiteur de la furine n'a aucun effet sur l'augmentation de l'expression de BDNFm dans le milieu suite à une HFS, tandis que le PAI-1 diminue significativement cette expression. Enfin, cette étude a démontré une sécrétion sélective du t-PA par les neurones ne pouvant être déclenchée que par la HFS. Ces résultats tendent donc à montrer que la HFS entraîne la sécrétion simultanée

par les neurones de proBDNF et de t-PA conduisant ainsi à la production de BDNFm, alors que la LFS entraîne uniquement la sécrétion de proBDNF. Toutefois, ces résultats sont en contradiction avec une étude ayant montré sur une culture de neurones hippocampiques une absence de sécrétion de proBDNF lors d'une HFS (Matsumoto et al., 2008). Cette différence pourrait être expliquée par la présence de cellules gliales dans les cultures de l'équipe de Matsumoto, qui sont connues pour être une source de t-PA à l'origine d'une potentielle conversion du proBDNF en BDNFm en réponse aux stimuli. En effet, une étude parue un an plus tard a mis en évidence que la dépolarisation des neurones hippocampiques aboutit à la sécrétion des deux formes de BDNF et que la présence de cellules gliales dans ces cultures augmente le clivage du pro-BDNF en BDNFm (Yang et al., 2009)

In vivo, il a été montré que l'activité du t-PA endogène est augmentée par un environnement enrichi (Horii-Hayashi et al., 2011, Obiang et al., 2011), la thérapie par électrochocs (Segawa et al., 2013) et par l'activité physique (Ding et al., 2011) tandis qu'un stress prénatal appliqué sur la mère gestante diminue l'activité du t-PA chez la progéniture (Yeh et al., 2012). De manière intéressante, ces études établissent toutes un lien entre l'activité t-PA et l'expression de la forme mature du BDNF. Ainsi, plusieurs études ont montré à la suite de protocoles d'activité physique une corrélation entre l'expression du BDNFm et l'induction du gène codant le t-PA (Sartori et al., 2011), et surtout une suppression de l'augmentation de BDNFm induite par l'activité physique lorsque du t-PA STOP est injecté aux animaux avant la course sur tapis roulant (Ding et al., 2011). De même, l'activité du t-PA est diminuée dans l'hippocampe des souris soumises à un stress de contension (Bahi and Dreyer, 2012). Ce travail a également montré que la surexpression hippocampique de t-PA possède des effets antidépresseurs et anxiolytiques associés à une augmentation des taux de BDNF dans cette structure.

L'activation des NMDAR peut déclencher la LTP qui est désormais connue pour induire, comme la HFS, une augmentation de l'expression des ARNm codant à la fois le BDNF et le t-PA (Qian et al., 1993). De plus, le BDNFm sécrété au niveau des synapses glutamatergiques est capable d'activer les récepteurs TrkB pré- et post-synaptiques déclenchant la LTP en modulant l'expression de certains gènes notamment celui codant le t-PA (Bramham and Messaoudi, 2005). Ainsi, le BDNF est à l'origine d'une augmentation des ARNm codant le t-PA et favorise le relargage neuronal de la protéase au niveau des neurones corticaux (Fiumelli et al., 1999). En effet, la présence sur le promoteur du gène

codant le t-PA de « régions de réponse au BDNF » a été mise en évidence à la fin des années 2000 (Daniel et al., 2007). L'ensemble de ces données semblent mettre en évidence l'existence d'une boucle d'amplification mettant en jeu le BDNF et le t-PA. De ce fait, le BDNF serait capable d'augmenter la synthèse et la sécrétion du t-PA qui lui-même augmenterait l'expression du gène codant BDNF. Cette hypothèse est représentée schématiquement dans la figure 26.

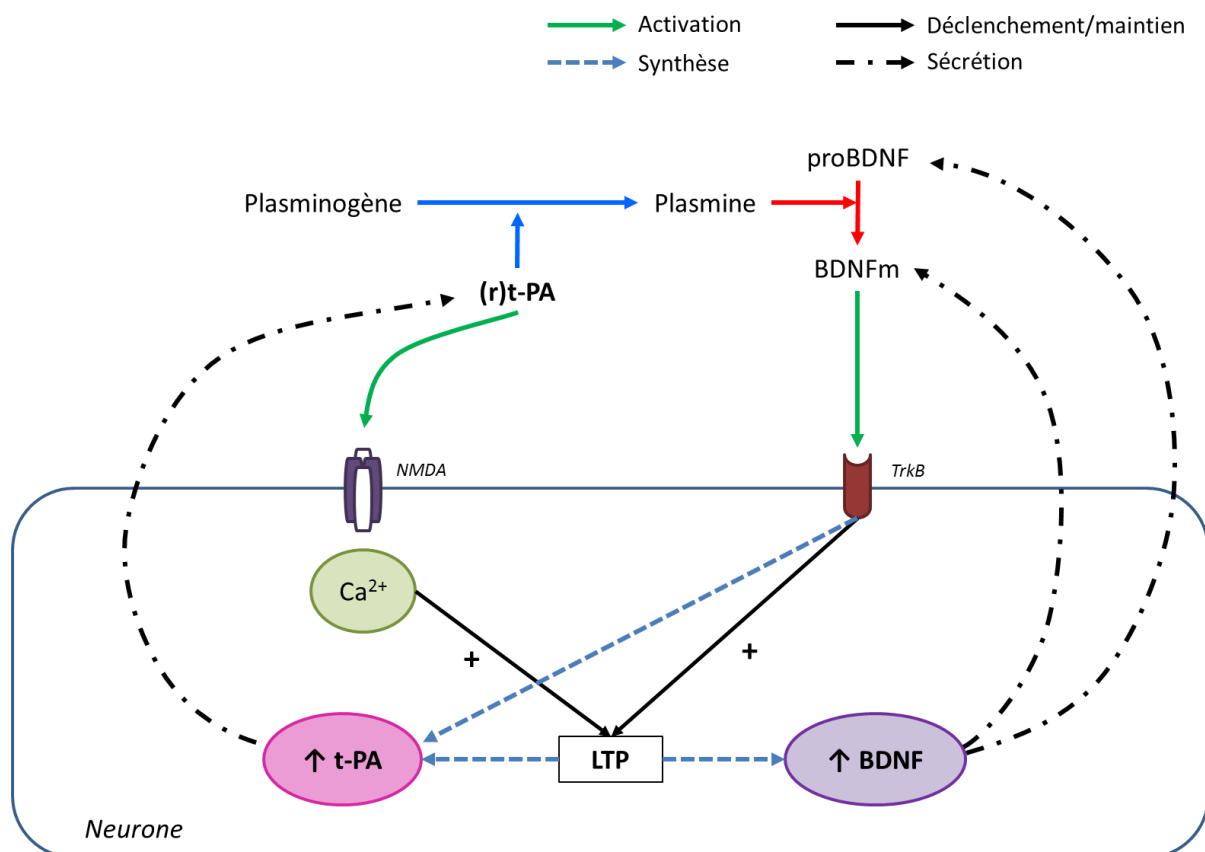


Figure 26 - Schéma représentatif de l'hypothèse du déclenchement d'une boucle d'amplification mettant en jeu le (r)t-PA et le BDNF.

PARTIE 2 : MATERIELS ET METHODES

I. Techniques physiologiques

A. Animaux

Les expériences ont été conduites chez le rat Wistar mâle (290–310 g, Depré et Janvier) et ont été menées après validation des protocoles par le Comité d'Éthique de l'Expérimentation animale de l'Université de Bourgogne. Les animaux ont été hébergés à 5 par cage, la nourriture et l'eau données *ad libitum* et les rats maintenus sous un cycle jour/nuit constant de deux fois 12 h.

B. Protocole pharmacologique

Les animaux sont anesthésiés à l'hydrate de chloral (400 mg/kg, 10 ml/kg, i.p., Sigma), puis un cathéter est placé soit au niveau de la veine du pénis soit au niveau de la veine jugulaire. Le choix de la veine d'injection se fait en fonction du temps auquel l'euthanasie est prévue, si l'animal est euthanasié 2h après le début de l'injection de l'agent pharmacologique, le cathéter est placé dans la veine du pénis, si l'euthanasie intervient 24h après le début de l'injection, la jugulaire sera préférée.

Une fois le cathéter en place, la forme recombinante de l'activateur du plasminogène, le rt-PA (Alteplase ACTILYSE® Boehringer Ingelheim, Paris, France), est injectée à la dose de 10 mg/kg. Cette dose est environ 10 fois supérieure à celle utilisée chez l'Homme (0,9mg/kg). En effet, le t-PA humain est reconnu comme étant 10 fois moins efficace sur le plasminogène du rongeur, même si cette notion a été remise en question par une étude récente (Haelewyn et al., 2010). La perfusion est débutée par un bolus sur 1 min représentant 10% de la dose à administrer, suivi d'une perfusion lente sur 1h des 90% restants, conformément au protocole utilisé en clinique. L'acide tranexamique, un inhibiteur de la plasmine, [TXA (EXACYL® Sanofi Aventis, Paris, France)] est injecté suivant le même protocole aux doses de 30 mg/kg ou 300 mg/kg. Enfin, le MK801, un antagoniste non spécifique des récepteurs NMDA (Ab120027, Abcam, Cambridge, UK) est injecté en bolus par voie intrapéritonéale (Tableau 7).

Tableau 7- Récapitulatif des agents pharmacologiques utilisés et de leur mode d'administration.

	véhicule	rt-PA	Acide Tranexamique (TXA)	MK801
Composition, dose	L-Arginine + eau ppi 3,5 g/L	ACTILYSE® + eau ppi 10 mg/kg	EXACYL® +/- eau ppi 30 mg/kg ou 300 mg/kg	MK801+NaCl 0,9 % 0,3 mg/kg ou 3 mg/kg
Voie d'administration	i.v.	i.v.	i.v.	i.p.
Protocole d'administration	Bolus sur 1min (10% de la dose) puis perfusion lente sur 1h (90% de la dose)	Bolus sur 1min (10% de la dose) puis perfusion lente sur 1h (90% de la dose)	Bolus sur 1min (10% de la dose) puis perfusion lente sur 1h (90% de la dose)	Bolus

Le traitement par rt-PA peut être associé soit à un traitement par TXA, les deux perfusions seront alors réalisées simultanément, soit à un traitement par MK801, dans ce cas l'injection de ce dernier se fera de manière concomitante avec le bolus de rt-PA (figure 27).

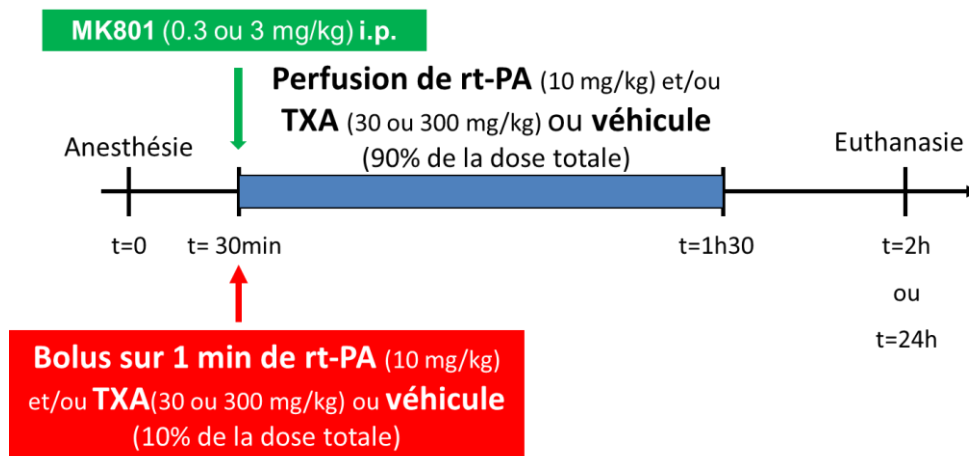


Figure 27- Schéma récapitulatif des protocoles d'injection des agents pharmacologiques.

Le traitement par rt-PA a été précédé par une ischémie focale permanente par photothrombose dans le cas de l'étude 2.

C. Modèle d'ischémie focale permanente par photothrombose

Ce modèle consiste à administrer par voie systémique un colorant photosensible, le rose Bengale qui, une fois irradié par le faisceau laser, transfère de l'énergie à une molécule d'O₂, donnant naissance à l'oxygène singulet. Ce dernier induit des lésions endothéliales qui conduisent à la formation d'agrégats plaquettaires puis de thrombi vasculaires occlusifs au niveau de la zone irradiée. Il se développe alors un infarctus circonscrit au cortex qui atteint chez le Rat, son volume maximal en 24h (Grome *et al.*, 1988 ; Norris *et al.*, 1994 ; Lee *et al.*, 1996 ; Demougeot *et al.*, 2003). La figure 28 schématise le principe de ce modèle.

1. Réalisation de l'ischémie

Après anesthésie à l'hydrate de chloral (400 mg/kg, 10 ml/kg, i.p., Sigma), l'animal est placé sur un appareil stéréotaxique (Kopf), la peau du crâne est incisée à l'aide d'un scalpel puis l'os du crâne est dégagé. La température corporelle et celle de la tête sont contrôlées et maintenues à 37°C à l'aide d'un tapis chauffant (Havard Apparatus). Le centre de la fibre optique est positionné 0,2 mm au-dessus de l'os du crâne selon les coordonnées stéréotaxiques suivantes par rapport au bregma : antéropostérieur : -0,5 mm, latéral : 3,5 mm, le bregma et le lambda étant placés dans un plan horizontal.

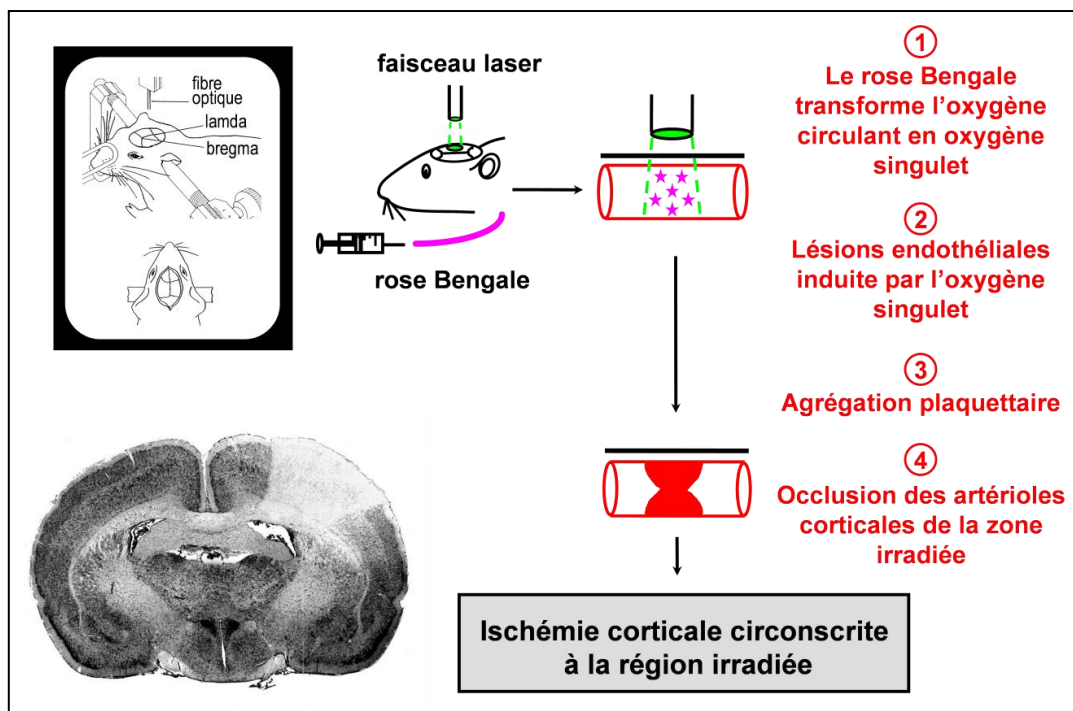


Figure 28-Principe de l'ischémie focale permanente par photothrombose.

La solution de rose Bengale (disodium tétraiodo-tétrachloro-fluorescéine, Aldrich) est diluée à 20 mg/ml dans du sérum physiologique (NaCl 0,9 %) puis filtrée (0,22 μ m). Elle est ensuite perfusée (20 mg/kg, 1 ml/kg) à l'aide d'un pousse-seringue (Harvard Apparatus) pendant 20 s au moyen d'une aiguille placée dans la veine jugulaire. L'os du crâne est irradié par la source laser 1 min avant, pendant, et 5 min après la perfusion de rose Bengale. L'irradiation est réalisée à l'aide d'une source laser à 532 nm (LCS-DTL-312, Laser quantum) transmise par une fibre optique de diamètre de 1 mm avec une puissance en sortie de fibre de 90 mW (Figure 28). Après suture des plaies, les animaux sont placés en cages individuelles avec libre accès à la nourriture et à la boisson.

2. Rinçage des cerveaux par voie transcardiaque

Après anesthésie des animaux au chloral (400 mg/kg, 10 ml/kg, i.p) et ouverture de la cage thoracique, le cœur est coupé au niveau de l'apex et une canule métallique est introduite dans le ventricule gauche jusqu'à l'aorte. Après incision de l'oreillette droite, le cerveau est perfusé par du NaCl 0,9 % sous une pression de 110 cm d'eau jusqu'à élimination complète du sang. Après 5 min de perfusion, soit environ 100 ml de NaCl, la canule est retirée et immédiatement après la perfusion l'animal, est décapité et le cerveau est extrait de la boîte crânienne.

3. Prélèvement des tissus cérébraux

Une fois rincés et prélevés, les cerveaux sont immédiatement posés sur une plaque réfrigérée. Après élimination du cervelet, les deux hémisphères sont séparés à l'aide d'un scalpel pour en extraire l'hippocampe, le striatum puis le cortex.

4. Prélèvement de sang

Après anesthésie au Chloral 4%, les animaux subissent un premier prélèvement de sang au niveau de la veine jugulaire gauche, puis un deuxième 1h après l'induction de l'ischémie, c'est-à-dire à la fin de la perfusion du ou des produits. Après 4h d'ischémie, les animaux sont cette fois anesthésiés à l'halothane. Ils sont préalablement placés dans une chambre à induction, jusqu'à anesthésie, puis celle-ci est maintenue en plaçant un masque délivrant un mélange adéquat. Un troisième prélèvement est alors réalisé dans la même jugulaire. Enfin, 24h après induction de l'ischémie, les animaux sont à nouveau anesthésiés

au Chloral 4%, avant de subir un dernier prélèvement au niveau de la jugulaire gauche puis d'être soumis à la perfusion transcardiaque.

Un volume de 0,5 ml de sang est prélevé les 4 fois, et sont récupérés dans des tubes « secs » (BD Vacutainer®, SST II Advance), puis placés au réfrigérateur à 4°C pendant 1 à 4h, avant d'être centrifugés (D-1.)

II. Techniques biochimiques

A. Extraction des protéines

Les prélèvements cérébraux sont homogénéisés dans 7 volumes de tampon de lyse [Tris 50 mM, NaCl 150 mM, acide tétraacétique d'éthylène glycol (EGTA) 1 mM, triton X-100 1 %] additionné d'inhibiteurs de protéases* 1%. Les tissus sont broyés directement dans le tube de stockage, à l'aide d'un « mini potter » plastique pour les Eppendorf, d'un Ultra-Turrax pour les cortex entiers, tout en étant maintenus dans la glace. L'extrait est ensuite soumis à des ultrasons pendant 15 s, puis centrifugé à 14000 g (3K30, Sigma) pendant 30 min à 4°C. Le surnageant est finalement aliquoté puis conservé à -80°C.

* : Inhibiteur de protéases (P8340, Sigma) contenant : AEBSF (4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride), aprotinine, bestatine hydrochloride, E-64 (N-(trans-epoxysuccinyl)-L-leucine 4-guanidinobutylamide), hémisulfate leupeptine et pepstatine A (Sigma P8340).

B. Dosage des protéines

Les protéines de chaque homogénat tissulaire sont dosées par la méthode de Lowry.

C. Technique de Western Blotting

La technique de Western blotting est une méthode qui permet la séparation des protéines en fonction de leur masse moléculaire couplée à leur détection par des anticorps spécifiques. Elle ne permet cependant qu'une évaluation semi-quantitative de l'expression d'une protéine donnée.

Cette technique a été employée pour mettre en évidence l'expression du proBDNF, du BDNFm, de phospho-TrkB, de TrkB-FL et de β -actine dans les surnageants d'homogénats tissulaires d'origine cérébrale (cortex, hippocampe et striatum). L'expression des protéines

cibles est évaluée en unités arbitraires (mesure d'absorbance=DO) sous forme de ratio DO protéine d'intérêt / DO marqueur interne (β -actine) (Figure 4).

1. Préparation des échantillons

Les surnageants d'homogénats, conservés à -80°C , sont décongelés à la température de la glace fondante. Un volume de chaque surnageant correspondant à la quantité totale de protéines désirée (cf tableau) est dilué au $\frac{1}{2}$ dans du tampon dénaturant Laemmli 2X (125mM Tris pH 6,8, SDS 4%, glycérol 20%, bleu de bormophénol 0.002%) puis complété à volume équivalent pour chaque échantillon avec du tampon Laemmli 1X. Une dénaturation est ensuite effectuée par ajout de 5% de β -mercaptoéthanol et chauffage à 85°C pendant 10 min. Après centrifugation, les échantillons sont prélevés.

2. Préparation des gels d'électrophorèse

Les gels d'électrophorèse sont constitués de chaînes polymérisées d'acrylamide reliées par un agent bifonctionnel : le bisacrylamide qui confère sa rigidité au gel et permet la formation d'un réseau au travers duquel les complexes SDS-protéines migrent.

Le tampon Tris (0,5M Trizma-base, 0,4% SDS, pH 6,8 pour le gel de concentration et 1,5M Trizma-base, 0,4% SDS, pH 8,8 pour le gel de séparation) et la solution d'acrylamide-bisacrylamide 40% (EUROMEDEX) sont mélangés dans des proportions permettant d'obtenir un gel à la concentration souhaitée : 4% pour le gel de concentration et 10% ou 12% pour le gel de séparation en fonction de la protéine à analyser. La polymérisation des gels est réalisée par addition de 0,2% (gel de séparation) à 0,5% (gel de concentration) d'ammonium persulfate (APS, Sigma-Aldrich) et de 0,1% de N, N, N', N'-téraméthyléthylène diamine (TEMED, EUROMEDEX). En pratique, le gel de séparation puis le gel de concentration dans lequel sont délimités des puits à l'aide d'un peigne, sont successivement coulés entre deux plaques de verre (BIO-RAD Laboratories).

3. Réalisation de l'électrophorèse

Après polymérisation, les gels sont installés de part et d'autre de l'appareil à électrophorèse, introduits dans la cuve et immergés dans le tampon de migration Tris/Tricine/SDS (100mM Tris, 100mM Tricine, 0,1% SDS, pH 8,3). Les échantillons ainsi que les marqueurs de masse moléculaire (10-250kDa, Prestained Protein Ladder Plus,

EUROMEDEX) sont alors déposés dans chacun des puits délimités au sein du gel de concentration. L'électrophorèse est effectuée à +4°C sous ampérage progressif allant de 10 à 25 mA (pour deux gels) jusqu'à ce que le front de migration atteigne l'extrémité inférieure du gel.

4. Transfert

Le transfert des protéines du gel de polyacrylamide sur une membrane de PVDF (0,2µm, BIO-RAD Laboratories) préalablement imbibée pendant 10 min dans un tampon de transfert (tampon carbonate : 10 mM NaHCO₃, 3 mM Na₂CO₃, 20% méthanol, pH 9,9), est effectué en milieu liquide pendant 2h sous un courant de 200 mA et sous agitation. Un bloc de glace est positionné à l'intérieur de la cuve de transfert afin d'éviter un réchauffement trop important (Figure 29).

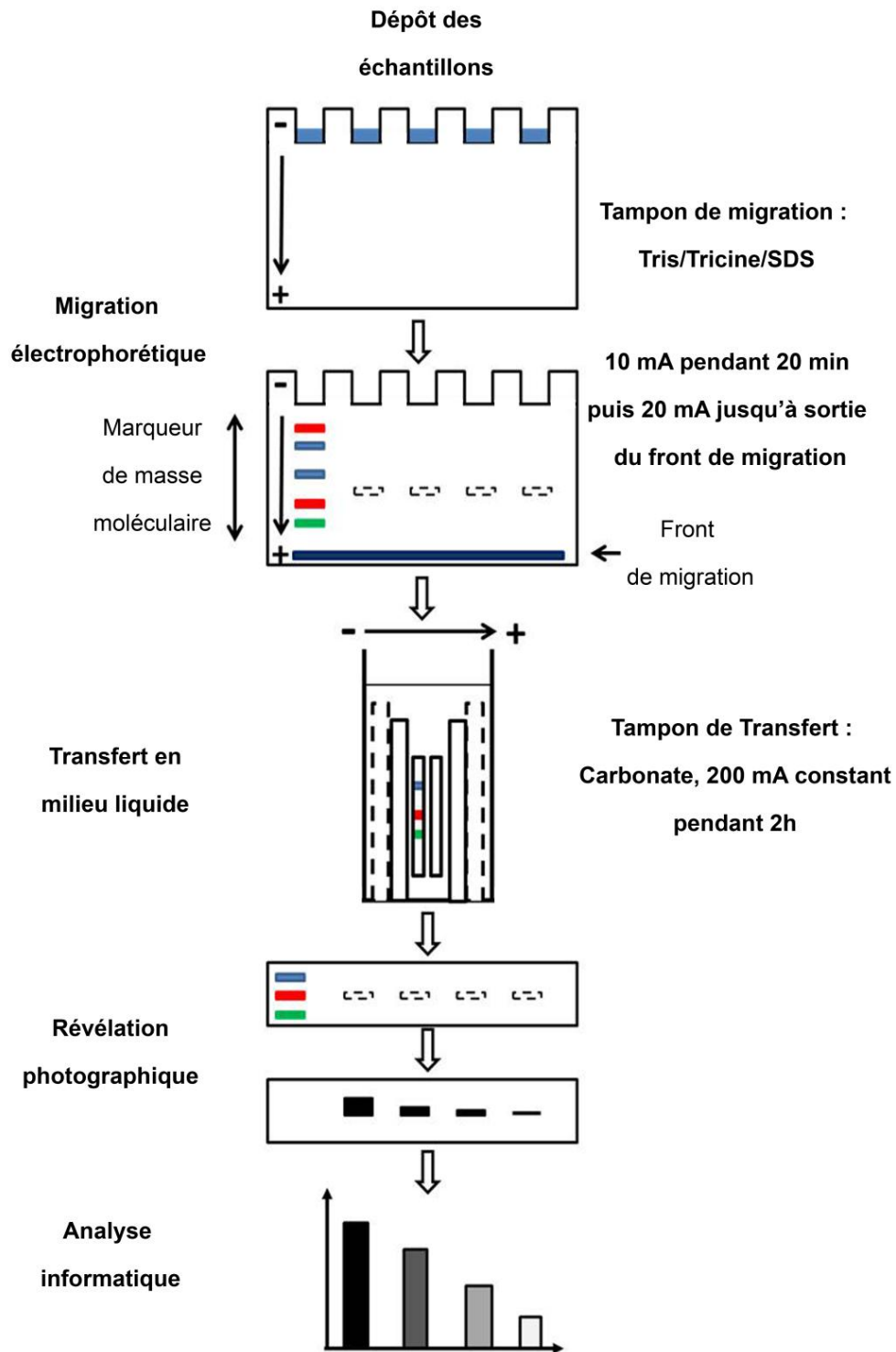


Figure 29-Protocole de Western blotting.

5. Immunoblotting et révélation

Le détail des anticorps utilisés est présenté dans le tableau 8.

Afin de bloquer les sites non spécifiques, la membrane de PVDF est placée une nuit à +4°C dans du tampon TBS-T [Tris Buffered Saline (50 mM Tris, 138 mM NaCl, 2,7 mM KCl,

pH 8) avec 0,1% de Tween 20] contenant soit 5% de lait écrémé soit 7,5% d'albumine bovine (BSA, SIGMA) qui contrairement au lait contient peu de protéines phosphorylées susceptibles d'interférer avec la reconnaissance des protéines d'intérêt elles-mêmes phosphorylées. Après trois rinçages de 10 min sous agitation lente dans du TBS-T, la membrane est incubée pendant 3h en présence de l'anticorps primaire (Ac I^r), rincée trois fois pendant 10 min dans du TBS-T, puis incubée 2h minimum avec l'anticorps secondaire (Ac II^r) correspondant couplé à une peroxydase. Les Ac I^r (additionnés ou pas de 5% de lait écrémé ou 5% de BSA) et II^r sont dilués dans du TBS-T (additionnés ou non de BSA 0,9%). Après trois lavages de 10 min dans du TBS-T, les complexes antigène-anticorps sont révélés par une réaction de chimiluminescence à l'aide du kit ECL+ (Enhanced Chemiluminescence Plus, GE Healthcare, VWR). En chambre noire, la membrane de PVDF est incubée pendant 5 min avec les réactifs du système ECL+, avant d'être mise en contact avec un film photographique. Après 30 s à 5 min d'exposition dans une cassette, le film est ensuite passé successivement dans des bains de révélateur (AL-4, Kodak) et de fixateur (LX-24, Kodak), rincé puis séché (Figure 30).

L'acquisition des films est réalisée à l'aide du densitomètre GS-800 (BIO-RAD Laboratories) et la quantification des bandes d'expression protéique est réalisée à l'aide du logiciel d'analyses d'images Quantity One (BIO-RAD Laboratories).

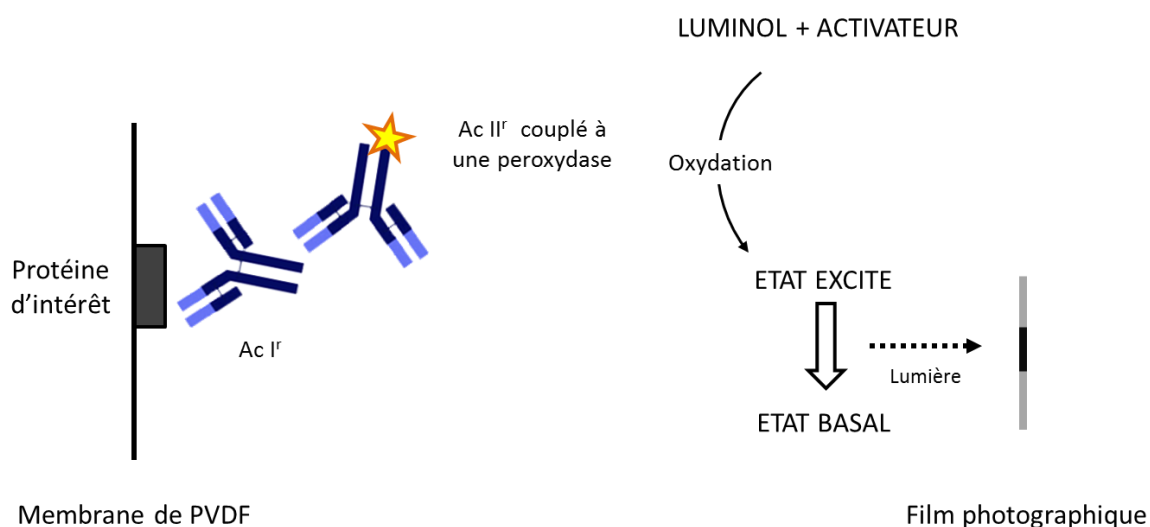


Figure 30-Principe de détection du kit ECL+.

Tableau 8- Description des conditions de Western blotting en fonction de la protéine d'intérêt.

Protéines cibles	Masse moléculaire	Quantité protéines déposées	% de polyacrylamide du gel de séparation	Ac I'	Dilution Ac I'	Ac II'	Dilution Ac II'
ProBDNF	35 kDa	30 µg	12	Anti-proBDNF Merck-Millipore (AB5613P) Polyclonal rabbit	1/2000	Anti-Rabbit Jackson Immunoresearch (115-035-144)	1/50000
BDNFm	15 kDa	30 µg	12	Anti-BDNF Euromedex (Epitomics 3160-1) Monoclonal rabbit	1/3000	Anti-Rabbit Jackson Immunoresearch (115-035-144)	1/30000
p-TrkB	145 kDa	30 µg	10	Anti-TrkB (phospho Y515) Abcam (ab51187) Polyclonal rabbit	1/1000	Anti-Rabbit Jackson Immunoresearch (115-035-144)	1/30000
FL-TrkB	90-145 kDa	30 µg	10	Anti-TrkB BD Biosciences (610101) Monoclonal mouse	1/1000	Anti-Mouse Jackson Immunoresearch (115-035-166)	1/50000
β-Actine	42 kDa	30 µg	10-12	Anti- β-Actine Sigma-Aldrich (A5441) Monoclonal mouse	1/5000	Anti-Mouse Jackson Immunoresearch (115-035-166)	1/50000

D. Technique ELISA pour le dosage du BDNF

1. Préparation des échantillons tissulaires et circulant pour dosage du BDNF

La préparation des échantillons tissulaires est réalisée comme décrit précédemment (II-A). En ce qui concerne la préparation des échantillons circulant, après prélèvement, les tubes sont stockés au réfrigérateur à 4°C pendant 1 à 4h, ils sont alors centrifugés à 2000 g pendant 15min à 4°C (Centrifugeuse JOUAN GR 412). Les échantillons sont alors congelés à -80°C pour dosage ultérieur du BDNF selon la technique ELISA

2. Réalisation des dosages du BDNF circulant et tissulaire

Les dosages du BDNF circulant (sérique, murin ou humain) et tissulaire sont réalisés par méthode ELISA, à l'aide d'un kit Chemikine™ (laboratoire Millipore). L'échantillon (100 µl) est introduit dans les puits de la microplaque du kit. Les parois de ces puits sont tapissées d'anticorps anti-BDNF polyclonaux qui capturent le BDNF de l'échantillon. La microplaque est alors incubée pendant une nuit, à une température de +4°C, sous agitation

lente. Après rinçage minutieux des puits, 100 µl d'anticorps biotinylés anti-BDNF sont ajoutés dans chacun d'eux. Le BDNF de l'échantillon est alors pris en sandwich entre ces deux anticorps. La plaque est alors incubée à température ambiante et sous agitation lente pendant 3 heures. Un nouveau rinçage est ensuite réalisé et 100 µl d'une solution de streptavidine-HRP (Horseradish peroxydase) sont introduits dans chaque puits. La streptavidine qui a une très forte affinité pour la biotine va alors se fixer à l'anticorps préalablement incubé. Après une nouvelle incubation d'une heure à température ambiante et à l'abri de la lumière, 100 µl d'une solution de TMB/E (3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine) sont introduits dans chaque puits. Ce chromogène TMB/E réagit avec l'enzyme HRP en donnant une coloration bleue au milieu. Après exactement 15 min d'incubation à température ambiante, sous agitation lente, la réaction est arrêtée par une solution de blocage pour donner une coloration jaune. La densité optique (450 nm) est lue immédiatement après à l'aide d'un lecteur de microplaque (Wallac Victor² 1420 Multilabel Counter). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de BDNF qui est calculée à partir d'une gamme d'étalonnage préparée à l'aide d'une solution mère de BDNF fournie dans le kit de concentration connue.

Des études préliminaires ont été conduites afin d'évaluer si l'échantillon à doser devait être introduit pur ou dilué dans les puits. Nous avons choisi de diluer les échantillons cérébraux au 1/10 dans le tampon d'extraction puis ensuite au ½ dans le diluant fourni par le kit et préalablement supplémenté en albumine sérique bovine (2%). En revanche, les échantillons circulants sont introduits dans les puits non dilués pour les plasmas et dilués au 1/20 pour les sérums.

E. Technique de fluorimétrie pour mesure d'activité enzymatique.

Le kit Sensolyte® AMC tPA Activity Assay est optimisé pour la mesure de l'activité enzymatique de l'activateur tissulaire du plasminogène. Ce kit contient un substrat fluorogène caractérisé par une grande réactivité et un faible bruit de fond. Le t-PA clive le substrat aboutissant ainsi à la libération du fluorophore AMC (7-amino-4-méthylcoumarine). La fluorescence est détectée à des longueurs d'ondes d'excitation/émission = 354/442 nm.

Le kit Sensolyte® Rh110 Plasmin Assay permet la détection de l'enzyme plasmine ou la mesure en continu de l'activité de l'enzyme en utilisant un substrat fluorogénique. Après

clivage par la plasmine, le substrat génère le Rh110 (rhodamine 110), un fluorophore qui produit une fluorescence verte claire et peut être détectée à des longueurs d'ondes d'excitation/émission = 496/520 nm.

1. Préparation des échantillons tissulaires pour mesure des activités t-PA et Plasmine

Après perfusion transcardiaque d'environ 200 ml de NaCl 0.9%, le cerveau est extrait de la boîte crânienne et disséqué (sur plaque de verre à 0°C). Les structures cérébrales (hippocampe, striatum, cortex) sont séparés et congelés immédiatement à -80°C. Toutes les structures sont homogénéisées dans du tampon PBS (Phosphate Buffered Saline pH 7.4, SIGMA) contenant 1% de TRITON X100, dans 5 ou 7 volumes pour la mesure de l'activité plasmine et t-PA respectivement, directement dans le tube de stockage, à l'aide d'un « mini potter » plastique pour les Eppendorf, d'un Ultra-Turrax pour les cortex. Aucun cocktail d'inhibiteur de protéases n'est ajouté, afin d'éviter les interférences avec les mesures d'activité. Chaque homogénat est ensuite passé 15 s au sonicateur. L'ensemble de la manipulation doit être réalisé dans la glace. Les homogénats sont centrifugés à +4°C, 30 min à 14000g (centrifugeuse Sigma 3 K 30, rotor n°12154). Les tubes sont systématiquement remis dans la glace pilée, le temps d'aliquoter chaque surnageant dans un ou plusieurs Eppendorf 0,5ml puis congelés à -80°C.

2. Réalisation

Une prise d'essai de 40 à 100 µL (Tableau 9) est déposée dans chaque puits d'une plaque 96 puits noire, à température ambiante. Un volume de 40 µL de substrat est ensuite ajouté dans chaque puits, juste avant le début de l'analyse sur Wallac Victor² 1420 Multilabel Counter. Une mesure est alors réalisée toutes les 5 min pendant 90 min.

Tableau 9- Description des conditions de fluorimétrie en fonction de l'enzyme d'intérêt.

	t-PA		Plasmine	
	Homogénat cérébral	Sérum	Homogénat cérébral	Sérum
Dilution de l'échantillon	/	1/50	/	1/50
Prise d'essai	40 µL	40 µL	100 µL	40 µL
Volume de substrat	40 µL	40 µL	40 µL	40 µL
Longueurs d'onde d'excitation /émission	354/442 nm	354/442 nm	496/520 nm	496/520 nm

III. Etude clinique

1. Objectif principal

Etudier la cinétique des taux sériques de BDNF chez les patients victimes d'un AVC bénéficiant ou non d'un traitement fibrinolytique par rt-PA.

2. Objectifs secondaires

- Etudier les variations d'activité t-PA dans le sérum chez les patients victimes d'un AVC bénéficiant d'un traitement par fibrinolyse intra-veineuse et la comparer à celle observée chez les patients victimes d'un infarctus cérébral non fibrinolysés.
- Etudier les corrélations entre les taux sériques de BDNF et l'activité t-PA.
- Etudier l'impact du nombre de plaquettes sur les taux sériques de BDNF.
- Comparer la récupération fonctionnelle des patients fibrinolysés à celle des patients non fibrinolysés.
- Etudier les corrélations entre les taux circulants de BDNF et la récupération fonctionnelle des patients.
- Etudier les corrélations entre les taux circulants de BDNF et l'activité t-PA du sérum et les marqueurs pronostics de l'AVC tels que le score cardiovasculaire, la présence de facteurs de risque cardiovasculaire, ou encore le délai de prise en charge du patient.

B. Méthodes

1. Schéma d'étude

Il s'agit d'une étude prospective longitudinale, monocentrique, incluant les patients hospitalisés pour infarctus cérébral aux urgences neurovasculaires (UNV) du centre hospitalier universitaire (CHU) de Dijon entre novembre 2010 et avril 2012.

2. Population étudiée

a) Critères d'inclusion des malades

- Patients victimes d'un AVC *de novo* récent < 12 heures.
- Patients âgés de 18 ans ou plus.
- Heure du début des symptômes connue.
- Sévérité de l'infarctus cérébral mesuré par le score NIHSS compris entre 4 et 25.
- Patients ayant donné leur consentement pour participer à l'étude.

b) Critères de non-inclusion des malades

- Heure du début des symptômes inconnue.
- Patients présentant une hémorragie cérébrale ou une hémorragie sous-arachnoïdienne.
- Patients présentant un accident ischémique transitoire.
- Patients présentant des troubles aphasiques sévères avant l'AVC ou à l'admission (note ≥ 2 à l'item 9 du score NIHSS).
- Patients présentant une démence préalable à l'infarctus cérébral.
- Patients présentant une perte d'autonomie significative avant l'admission (mRankin ≥ 4).
- Femmes enceintes ou allaitantes.
- Majeurs sous tutelle ou curatelle.
- Sujets privés de liberté.
- Personnes non bénéficiaires d'un régime de sécurité sociale.
- Patients ne parlant pas français.

3. Critères de jugement

a) Critère de jugement principal

Le critère de jugement principal repose sur la mesure des taux sériques de BDNF obtenus lors de la réalisation de prélèvements sanguins veineux à différents temps :

- J0 : immédiatement à l'admission au sein de l'UNV. Pour les patients bénéficiant d'une fibrinolyse intraveineuse, ce temps correspond à la valeur pré-fibrinolyse.
- J1 : le lendemain matin de l'admission à l'UNV. Le prélèvement sanguin sera réalisé à 8h00.
- J7 : au 7^{ème} jour suivant l'hospitalisation. Le prélèvement sanguin sera également réalisé à 8h00.
- J90 : au cours de la visite de contrôle, soit 3 mois après l'admission.

b) Critères de jugement secondaires

- La récupération fonctionnelle des patients sera évaluée par le score NIHSS à J0, J1, J7 et J90.

C. Variables d'intérêt

1. Données sociodémographiques :

- Age.
- Sexe.

2. Autonomie et dépendance physique préalable à l'infarctus cérébral :

- La dépendance physique évaluée par l'échelle de Rankin modifiée.

3. Antécédents médicaux :

- Facteurs de risques cardiovasculaires : hypertension artérielle, diabète et hypercholestérolémie.
- Calcul du score cardiovasculaire (SCV) grâce à l'échelle de l'ESC (European Society of Cardiology) (Figure 31). Les données biologiques utilisées pour le calcul du SCV sont celles mesurées à l'admission du patient.

- Antécédents cardiovasculaires personnels et familiaux.
- Autres antécédents.

Score de l'ESC																					
PA systolique (mm Hg)	Femmes										Age (ans)	Hommes									
	Non fumeuses					Fumeuses						Non fumeurs					Fumeurs				
	4	5	6	7	8	4	5	6	7	8		4	5	6	7	8	4	5	6	7	8
180	4	5	6	6	7	9	9	11	12	14	65	8	9	10	12	14	15	17	20	23	26
160	3	3	4	4	5	6	6	7	8	10		5	6	7	8	10	10	12	14	16	19
140	2	2	2	3	3	4	4	5	6	7		4	4	5	6	7	7	8	9	11	13
120	1	1	2	2	2	3	3	3	4	4		2	3	3	4	5	5	5	6	8	9
180	3	3	3	4	4	5	5	6	7	8	60	5	6	7	8	9	10	11	13	15	18
160	2	2	2	2	3	3	4	4	5	5		3	4	5	5	6	7	8	9	11	13
140	1	1	1	2	2	2	2	3	3	4		2	3	3	4	4	5	5	6	7	9
120	1	1	1	1	1	1	2	2	2	3		2	2	2	3	3	3	4	4	5	6
180	1	1	2	2	2	3	3	3	4	4	55	3	4	4	5	6	6	7	8	10	12
160	1	1	1	1	1	2	2	2	3	3		2	2	3	3	4	4	5	6	7	8
140	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2		1	2	2	2	3	3	3	4	5	6
120	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	2	2	2	2	3	3	4
180	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	50	2	2	3	3	4	4	4	5	6	7
160	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	2	2	2	2	3	3	4	5
140	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1		1	1	1	1	2	2	2	2	3	3
120	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1		1	1	1	1	1	1	1	2	2	2
180	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40	0	1	1	1	1	1	1	1	2	2
160	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
140	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
120	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
	4	5	6	7	8	4	5	6	7	8		4	5	6	7	8	4	5	6	7	8
Cholestérol mmol/l																					
■ ≥ 15% ■ 10%–14% ■ 5%–9% ■ 3%–4% ■ 2% ■ 1% ■ < 1%																					

Figure 31 - Echelle de score de l'ESC pour le calcul du score cardiovasculaire.

4. Données concernant l'AVC :

- Sévérité initiale de l'AVC mesurée par le score NIHSS.
- Cause de l'infarctus cérébral définie selon la classification TOAST.

D. Déroulement de l'étude

Pour chaque patient inclus, le consentement de participation est obtenu et un questionnaire anonyme est rempli par un médecin du service pour recueillir les données nécessaires à l'étude (critères de jugement et variables d'intérêt). Une validation

systematique des données du questionnaire à partir du dossier de chaque patient est effectuée au fur et à mesure par les neurologues du service.

Chacun des prélèvements sanguins réalisés au cours de l'étude est effectué par voie veineuse. Ils comportent le recueil sur un tube sec de 5 à 8 ml de sang destiné à l'analyse des taux de BDNF et de l'activité t-PA sériques. Le tube est identifié par les 2 premières lettres du nom et la première du prénom du patient ainsi que la date du prélèvement et le temps du prélèvement (J0, J1, J7 et J90). Le tube est stocké au réfrigérateur à une température de +4°C puis transféré au plus vite au laboratoire pour être traité (II-D-1).

Au total, pour chaque patient, quatre prélèvements sanguins veineux sont réalisés au cours de l'étude. Le premier prélèvement (J0) est réalisé à l'admission du patient au sein de l'UNV. Ce prélèvement est effectué de manière concomitante aux prélèvements usuels et ne nécessite pas de geste supplémentaire. Le deuxième prélèvement (J1) est réalisé le lendemain matin de l'admission du patient, au cours de la prise de sang habituelle. Là encore, ce prélèvement ne nécessite pas de geste supplémentaire au bilan habituel. Le troisième prélèvement (J7) est effectué au 7^{ème} jour suivant l'admission. Dans la mesure du possible, il est combiné aux examens biologiques réalisés dans le cadre de la prise en charge classique du patient. Enfin, le quatrième prélèvement (J90) est réalisé lors de la consultation de suivi auprès d'un neurologue du service à 3 mois de l'infarctus cérébral.

Au cours de cette consultation à 3 mois (J90) le score NIHSS est calculé. Ce suivi a eu lieu en même temps que la consultation de suivi systématique effectuée pour tous les patients 3 mois après un AVC rentrant dans le cadre du Réseau Bourgogne AVC.

Le design expérimental de notre étude est représenté de manière schématique dans la figure 32.

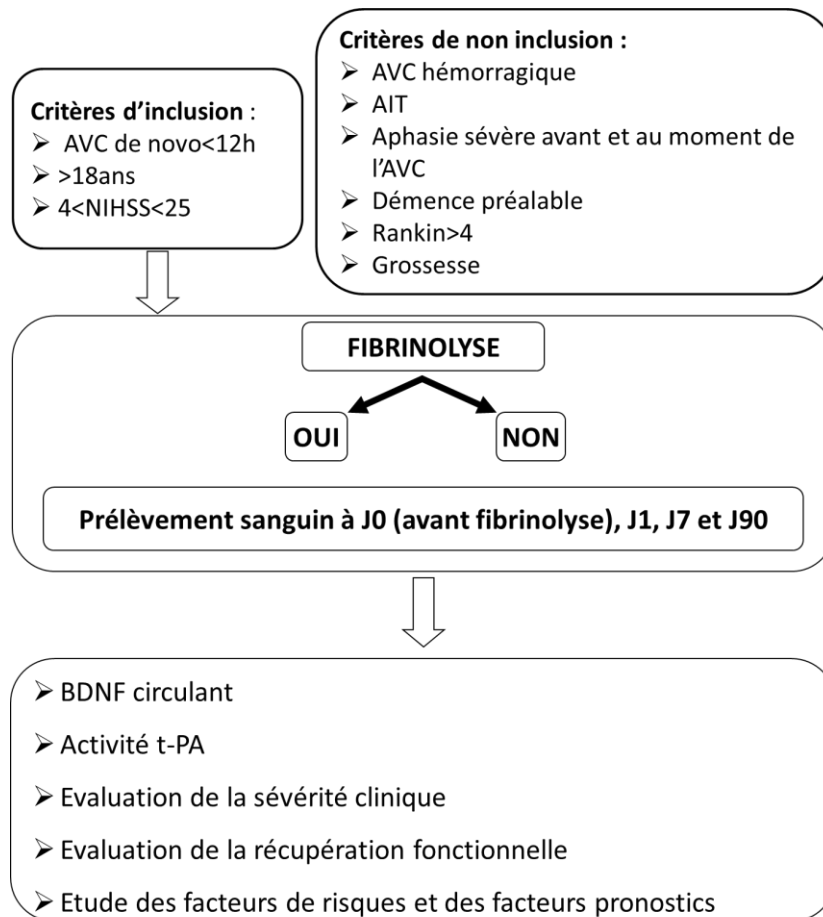


Figure 32- Design expérimental de l'étude

IV. Analyse statistique des résultats

Les résultats sont exprimés par les moyennes affectées de leur écart standard à la moyenne (SEM). La taille des échantillons étudiés étant petit, les résultats ont été analysés par des tests non paramétriques (logiciel SYSTAT9, Integral Software). La comparaison de deux groupes a été évaluée par le test de Mann-Whitney, le seuil de signification étant fixé à $p<0,05$. La comparaison de plus de deux groupes a été appréciée par le test de Kruskal-Wallis suivi du test de Mann-Whitney (comparaison de chacun des différents groupes deux à deux). Dans le cas d'une comparaison entre plusieurs groupes appariés, un test de Friedman a été réalisé, suivi d'un test de Wilcoxon et d'une correction de Bonferroni (seuil de significativité $p<0,05/n-1$).

Afin d'étudier l'existence d'une corrélation entre deux paramètres, un test de normalité de Shapiro-Wilk (seuil de signification, $p<0,05$) a été réalisé sur les populations. Si

la répartition des populations s'avérait normale, la recherche d'une corrélation entre deux paramètres était évaluée par l'utilisation du test de corrélation de Pearson (seuil de signification, $p < 0,05$). En cas d'échec du test de normalité, le test de corrélation de rang de Spearman (seuil de signification, $p < 0,05$) était utilisé.

Pour l'analyse des caractéristiques de la population (âge, facteurs de risques, étiologies,...), la comparaison des deux groupes a été réalisée grâce un test du χ^2 auquel a été appliqué la correction de Yates.

PARTIE 3 : PRESENTATION DES TRAVAUX

I. Etude 1 : Effet d'une perfusion de rt-PA sur le métabolisme du BDNF mature chez des rats non ischémiés. Analyse des mécanismes mis en jeu.

Titre :

Exogenous t-PA administration increases hippocampal mature BDNF levels.

Plasmin- or NMDA dependent mechanism?

Auteurs :

Marion Rodier, Anne Prigent-Tessier, Yannick Béjot, Agnès Jacquin, Claude Mossiat,
Christine Marie and Philippe Garnier.

Journal :

PLoS ONE, 2014 Mar 26;9(3):e92416.

A. Contexte et objectifs

La forme mature du brain-derived neurotrophic factor (BDNFm) est connue pour ses effets sur la neurotransmission, la neurogenèse et la synaptogenèse *via* l'activation des récepteurs TrkB. En raison du rôle de la plasmine dans le clivage du proBDNF en BDNFm, plusieurs études se sont intéressées au lien unissant le système t-PA/plasmine et le métabolisme du BDNF. De plus, si le t-PA a longtemps été connu uniquement pour son action fibrinolytique, il est désormais considéré comme un neuromodulateur grâce à son interaction avec les récepteurs NMDA.

Dans ce contexte, l'objectif de cette première étude a été d'étudier l'impact du rt-PA sur le métabolisme cérébral du BDNF chez le Rat.

B. Méthodes

Après anesthésie, les rats ont été perfusés par le véhicule (L-arginine 3,5% dans de l'eau ultra-pure) ou par rt-PA 10 mg/kg i.v., associés ou non à un inhibiteur de plasmine, l'acide tranexamique (TXA, 30 ou 300 mg/kg), sous forme d'un bolus sur 1 min représentant 10 % de la dose totale, suivi par 60 min de perfusion lente représentant 90 % de la dose. Un antagoniste des récepteurs NMDA, le MK801, a également été injecté en i.p. (0,3 ou 3 mg/kg) sous forme de bolus après le début de la perfusion de rt-PA ou de véhicule. L'hippocampe, le striatum et le cortex ont ensuite été prélevés à 2h ou à 24h après la perfusion, en vue :

- ✓ De la mesure de l'expression du BDNFm par Western blotting dans toutes les structures.
- ✓ De la mesure de l'expression du proBDNF par Western blotting dans l'hippocampe.
- ✓ De la mesure du ratio p-TrkB/FL-TrkB par Western blotting dans l'hippocampe.
- ✓ De la mesure de l'activité t-PA dans toutes les structures.
- ✓ De la mesure de l'activité plasmine dans l'hippocampe.

C. Principaux résultats

- ✓ Le rt-PA induit une augmentation de l'activité t-PA et de l'expression du BDNFm à 2h et à 24h uniquement dans l'hippocampe.

- ✓ Le TXA n'annule pas les effets du rt-PA sur l'expression du BDNFm, quels que soient le temps et la dose étudiés.
- ✓ Aucune variation de l'activité plasminogénique n'est observée dans l'hippocampe 2h après injection de rt-PA
- ✓ Le MK801 annule les effets du rt-PA sur l'expression du BDNFm, quels que soient le temps et la dose étudiés.
- ✓ Le rt-PA seul ou en association avec le TXA ou le MK801 ne modifie pas l'expression de proBDNF dans l'hippocampe, à 2h comme à 24h.
- ✓ Une augmentation de l'activation des récepteurs TrkB, objectivée par un accroissement du ratio p-TrkB/FL-TrkB, est observée chez les animaux traités par rt-PA seul ou en association avec le TXA dans l'hippocampe à 2h et à 24h. L'augmentation de ce ratio est absente chez les animaux traités par rt-PA + MK801.



Exogenous t-PA Administration Increases Hippocampal Mature BDNF Levels. Plasmin- or NMDA-Dependent Mechanism?

Marion Rodier^{1,2,4}, Anne Prigent-Tessier^{1,2}, Yannick Béjot^{4,5}, Agnès Jacquin^{4,5}, Claude Mossiat^{1,2}, Christine Marie^{1,2}, Philippe Garnier^{1,2,3*}

1 Unité INSERM U1093 Cognition, Action et Plasticité Sensorimotrice, Dijon, France, **2** Université de Bourgogne, Dijon, France, **3** Département Génie Biologique, IUT, Dijon, France, **4** Department of Neurology, University Hospital, Dijon, France, **5** Centre d'Epidémiologie des Populations, EA4184, Dijon, France

Abstract

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) through TrkB activation is central for brain functioning. Since the demonstration that plasmin is able to process pro-BDNF to mature BDNF and that these two forms have opposite effects on neuronal survival and plasticity, a particular attention has been paid to the link between tissue plasminogen activator (tPA)/plasmin system and BDNF metabolism. However, t-PA via its action on different N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunits is also considered as a neuromodulator of glutamatergic transmission. In this context, the aim of our study was to investigate the effect of recombinant (r)t-PA administration on brain BDNF metabolism in rats. In the hippocampus, we found that rt-PA (10 mg/kg) administration induced a progressive increase in mature BDNF levels associated with TrkB activation. In order to delineate the mechanism involved, plasmin activity was assessed and its inhibition was attempted using tranexamic acid (30 or 300 mg/kg, i.v.) while NMDA receptors were antagonized with MK801 (0.3 or 3 mg/kg, i.p.) in combination with rt-PA treatment. Our results showed that despite a rise in rt-PA activity, rt-PA administration failed to increase hippocampal plasmin activity suggesting that the plasminogen/plasmin system is not involved whereas MK801 abrogated the augmentation in mature BDNF levels observed after rt-PA administration. All together, our results show that rt-PA administration induces increase in hippocampal mature BDNF expression and suggests that rt-PA contributes to the control of brain BDNF synthesis through a plasmin-independent potentiation of NMDA receptors signaling.

Citation: Rodier M, Prigent-Tessier A, Béjot Y, Jacquin A, Mossiat C, et al. (2014) Exogenous t-PA Administration Increases Hippocampal Mature BDNF Levels. Plasmin- or NMDA-Dependent Mechanism? PLoS ONE 9(3): e92416. doi:10.1371/journal.pone.0092416

Editor: Thierry Amédée, Centre national de la recherche scientifique, University of Bordeaux, France

Received: September 30, 2013; **Accepted:** February 21, 2014; **Published:** March 26, 2014

Copyright: © 2014 Rodier et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from the University of Burgundy, the Region of Burgundy and the INSERM, France. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: pgarnier@u-bourgogne.fr

Introduction

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) serves survival and differentiation functions during the development of the nervous system [1,2]. In addition, BDNF has been reported to be central to adult brain functions including neuronal survival, maintenance and repair, modulating dendritic branching and spine morphology [3,4] and to be involved in activity-dependent synaptic modifications involved in learning and memory formation [5–7]. BDNF also represents a crucial signaling molecule in adaptive brain plasticity [8–10]. At the molecular level, BDNF is synthesized as pre-pro-BDNF that is processed to pro-BDNF by removal of the signal peptide. Pro-BDNF is then cleaved into mature BDNF within the endoplasmic reticulum by furin and/or in regulated secretory vesicles by protein convertase 1 whereas extracellularly, this cleavage is achieved by plasmin and some metalloproteinases [11]. Although the proteases as well as the compartment involved in the processing of pro-BDNF remain debated [12], mature BDNF signals through its high-affinity for tropomyosin-related kinase B (TrkB) receptor, thereby impacting positively brain function. Since the direct use of BDNF is limited by its pharmacokinetic profile [13], strategies aimed at inducing mature

BDNF production appear to be a promising option in the treatment of variety of CNS pathologies.

Tissue plasminogen activator (t-PA) is a serine protease that has been initially characterized to promote fibrinolysis in the vascular compartment through conversion of plasminogen into plasmin. However, t-PA production is not confined to endothelial cells since it is also synthesized by neurons and glia and exerts important function in the brain parenchyma by interacting with various substrates, proteins and receptors [14,15]. In physiological conditions, t-PA is involved during development, in neuronal migration and synaptic outgrowth while in the adult brain, t-PA is implicated in neurotransmission, synaptic plasticity and different cognitive functions [16–18]. However, in pathological conditions, experimental data have revealed that t-PA could have adverse effects and acts as pro-hemorrhagic and pro-excitotoxic factor [15]. To explain this multifaceted role, several plasmin-dependent and -independent mechanisms have been identified. Hence, it has been shown that t-PA through plasmin activation influences matrix degradation [19] and allows the extracellular conversion of pro-BDNF into its mature form [20,21]. Concerning plasmin-independent mechanisms, several studies have reported in glial cells and/or in neurons that t-PA can interact with lipoprotein-

receptor-related protein (LRP), annexin II and N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors (NMDARs) [15]. Concerning this latter, several groups have evidenced interaction and/or proteolytic implication of t-PA with different NMDAR subunits and suggested that t-PA should be also considered as a neuromodulator of glutamatergic transmission [14].

Regarding the potential link between t-PA and BDNF metabolism through either plasmin activity or activity-dependent secretion of BDNF through elevation of intracellular calcium levels mediated by the activation of NMDA receptors, the objective of our study was to investigate the effect of exogenous t-PA administration (recombinant (rt)-PA) on brain levels of mature BDNF in rats. In order to gain insight into mechanistic, rt-PA and plasmin activities were measured and a pharmacological approach using non-subunit-specific MK801 targeting NMDARs and tranexamic acid (TXA) as plasmin inhibitor was designed. In addition, the activation of TrkB receptors was assessed.

Materials and Methods

Reagents

Acrylamide and bis-acrylamide, sodium dodecylsulfate (SDS) and tween-20 were obtained from Bio-Rad (Ivry sur Seine, France). The polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes were purchased from GE Healthcare (Orsay, France). For Western blotting assessments, rabbit polyclonal anti-pro-BDNF (AB5613P) antibody was obtained from Merck-Millipore whereas the rabbit monoclonal antibody recognizing both BDNF forms (clone EPR 1292, Ref. 3160-1) was purchased from Epitomics (Euromedex, Souffelweysheim, France). The mouse monoclonal antibody raised against TrkB full length (ref 610102) and the rabbit polyclonal recognizing TrkB phosphorylated at tyrosine 515 (ab51187) were obtained from BD Biosciences (Franklin Lakes, US) and Abcam (Cambridge, UK), respectively. Mouse monoclonal anti- β -actin antibody (A5441) was purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO). For secondary antibodies, the horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit and -mouse antibodies were obtained from Jackson ImmunoResearch Laboratories (Interchim, France). For pharmacological approaches, rt-PA (Actilyse), tranexamic acid (Exacyl) were purchased from Boehringer Ingelheim (Paris, France) and Sanofi Aventis (Paris, France) whereas MK801 (Ab120027) was obtained from Abcam (Cambridge, UK).

Animals

The experiments were carried out on adult male Wistar rats (290–310 g; Dépre, Saint-Doulchard, France) and were conducted according to the French Department of Agriculture guidelines (license 21CAE099) and performed in order to comply with the 'Animal Research: Reporting In Vivo Experiments' ARRIVE guidelines. The animals were housed five per cage and kept under 12/12 h light/dark cycle and allowed *ad libitum* access to food and water. The experimental procedures were approved by the local committee for ethic in animal experimentation (agreement 6112). All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used. Due to the duration of anesthesia and the potential effects of barbiturate [22] and ketamine [23] on NMDA receptor signaling, all surgery was performed under chloral hydrate anesthesia (400 mg/kg, i.p.). Head/body temperatures were monitored and controlled during surgical procedure. The choice of doses and the route of administration of drugs have been made in agreement with the literature. All treated animals have been included in this study. In order to minimize the impact of circadian cycle, animals were

homogeneously allocated in each group with respect to the time of day at which the injection occurred.

After anesthesia (400 mg/kg; chloral hydrate; i.p.), animals were perfused with vehicle (L-Arginin 3.5% in deionized water, $n = 10$) or rt-PA 10 mg/kg i.v. (undialyzed, $n = 10$) combined or not with tranexamic acid (30 or 300 mg/kg, $n = 5$ and $n = 8$, respectively) as a bolus (10% of total dose) followed by a 60 min perfusion (90% of total dose) using pump infusion (Harvard Apparatus, 55–4150) to mimic the clinical utilization of rt-PA. For MK801 treatments, two doses were used (0.3 or 3 mg/kg, i.p., $n = 5$ and $n = 8$, respectively) as a bolus immediately after the beginning of vehicle or rt-PA infusion. Since blood contains BDNF, 2 h or 24 h after the beginning of drugs administration, animals were transcardially perfused with saline during 5 min to flush out blood from vasculature to avoid contamination, and then, the brains were removed. The cortices, striatum and hippocampi were quickly dissected on glass slide at 0°C. The different brain structures were immediately weighted and frozen at -80°C until further use.

Western Blotting

To assess the expression of the pro-BDNF, mature BDNF, Full length (FL)-TrkB, phosphorylated (p)-TrkB and β -actin by Western blotting analyses, the different cerebral samples were first homogenized in seven volumes of lysis buffer [bi-distilled water containing 100 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1% triton X-100, 1% protease inhibitors (Sigma P8340)] as previously described [24]. Then, the total protein extracts were sonicated and centrifuged at $14,000\times g$ for 20 min. An aliquot of supernatant was kept for BCA protein measurement and the remaining protein extracts were stored at -80°C .

Equal amounts of proteins were dissolved in Laemmli solution (62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10% glycerol, 0.001% bromophenol blue) with 2-mercaptoethanol 5% and were heated at 85°C for 10 min. Proteins were separated on 10% (p-TrkB) or 12% (Pro-BDNF, FL-TrkB and mature BDNF) SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and were electrophoretically transferred onto PVDF membrane (0.2 μm pore size) in cold transfer buffer [10 mM NaHCO_3 , 3 mM Na_2CO_3 (pH 9.9) and 20% methanol]. Specificity of the different BDNF antibodies was characterized previously [25]. The membranes were incubated overnight at 4°C in 5% non-fat dry milk or 7.5% BSA (p-TrkB) in TBS [20 mM Tris-HCl (pH 7.6) and 137 mM NaCl] containing 0.1% Tween 20 to block unspecific binding. They were then washed, incubated for 3 h at room temperature (RT) with anti-pro-BDNF (1/2000), anti-BDNF (1/3000 with 5% non fat dry milk), anti-FL-TrkB (1/1000), anti p-TrkB (1/1000 with 5% BSA) or anti- β -actin antibodies (1/5000). The membranes were washed with TBS-0.1% Tween 20 and then incubated for 2 h (RT) with either horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse IgGs or anti-rabbit IgGs. Protein-antibody complexes were visualized using enhanced chemiluminescence Western blotting detection system according to the manufacturer's protocol (ECL+, GE Healthcare, Orsay, France). The membranes were stripped and probed with an anti- β -actin antibody (1/5000) used as internal control. Pro- and mature BDNF, FL-TrkB, p-TrkB and β -actin band densities were determined by scanning densitometry (GS-800, Bio-rad, Ivry sur Seine, France). A computer-based imaging system (Quantity One, Bio-rad, Ivry sur Seine, France) was used to measure the relative optical density of each specific band. Data normalized on β -actin expression were expressed as percentage of increase as compared to control values.

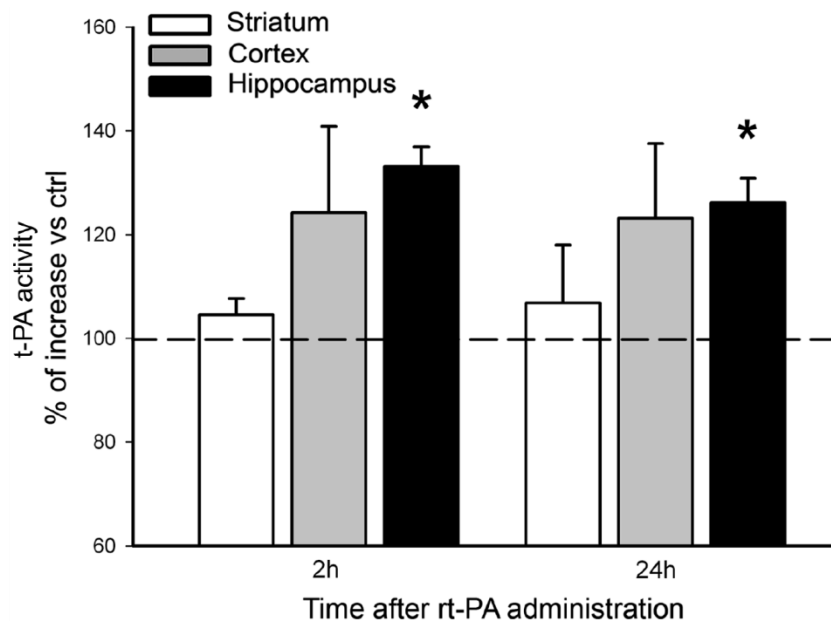


Figure 1. Effect of rt-PA (10 mg/kg) on t-PA activity in different brain structures. t-PA activity was assessed 2 h and 24 h after rt-PA or vehicle perfusion in the striatum, cortex and hippocampus. Data are presented as mean \pm SEM and are representative of 10 animals. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared to vehicle-treated animals. doi:10.1371/journal.pone.0092416.g001

t-PA Activity Assay

t-PA activity was measured using Sensolyte AMC t-PA Activity Assay (Anaspec, TEBU Bio, Le Perray-en-Yvelines, France) according to the manufacturer's protocol. Of note, measurements were performed on brain homogenates prepared as previously described for Western blotting experiments without protease inhibitors. Briefly, 50 μ l of fluorimetric substrate was incubated with 50 μ l of the different brain extracts. Measurements were performed in duplicate at 30°C over a 60 min period using multiplate reader (Wallac Victor² 1420 Multilabel Counter). Relative fluorescent unit (RFU) per min were normalized by protein concentration and data were expressed as percentage of increase as compared to control values.

Plasmin Activity Assay

Plasmin activity was measured using Sensolyte Rh 110 Plasmin Activity Assay (Anaspec, TEBU Bio, Le Perray-en-Yvelines, France) according to the manufacturer's protocol. Measurements were performed on brain homogenates prepared as previously described for Western blotting experiments without protease inhibitors. Briefly, 50 μ l of fluorimetric substrate was incubated with 100 μ l of the different brain extracts and 50 μ l of serum diluted to one-tenth in saline. Measurements were performed in duplicate at 30°C over a 60 min period using multiplate reader (Wallac Victor² 1420 Multilabel Counter). Relative fluorescent unit (RFU) per min were normalized by protein concentration and data were expressed as percentage of increase as compared to control values.

Statistics

All values were expressed as means \pm S.E.M. of n rats (five to ten animals in each group). Comparisons among groups of rats were made using non-parametric Kruskal–Wallis test followed by Mann–Whitney for independent variables. All statistical analysis was performed using systat 9.0 software (SPSS Science Soft-

wareGmb, Erkrath, Germany). Statistical significance was set at $P < 0.05$.

Results

Effect of rt-PA on t-PA Activity and Mature BDNF Expression

t-PA activity and mature BDNF expression were assessed in the striatum, the cortex and the hippocampus 2 h and 24 h after administration of either rt-PA (10 mg/kg, i.v., $n = 10$) or vehicle ($n = 10$). Concerning t-PA activity (figure 1), our results revealed that rt-PA induced a significant increase only in the hippocampus, 2 h and 24 h after perfusion as compared to vehicle treated animals. Concerning mature BDNF expression, Western blotting assessments showed that rt-PA treatment was associated with a significant and progressive rise of mature BDNF only in the hippocampus (Figure 2). Regarding both t-PA activity and mature BDNF expression in other brain regions, rt-PA exerted no significant effect and thus, whatever the time points considered.

Effect of TXA on rt-PA-induced Mature BDNF Expression

In order to evaluate the involvement of plasmin on rt-PA-induced mature BDNF upregulation in the hippocampus, animals received rt-PA perfusion combined with TXA (30 or 300 mg/kg, i.v.). As compared to animals treated with rt-PA alone ($n = 10$) (Figure 3A), no significant differences were observed in animals treated with rt-PA and TXA at either 30 or 300 mg/kg ($n = 5$ and $n = 8$, respectively). Indeed, animals treated with both pharmacological agents showed a significant increase in mature BDNF expression. Of note, animals treated with TXA alone, showed no variation in mature BDNF expression as compared to vehicle-treated animals (data not shown).

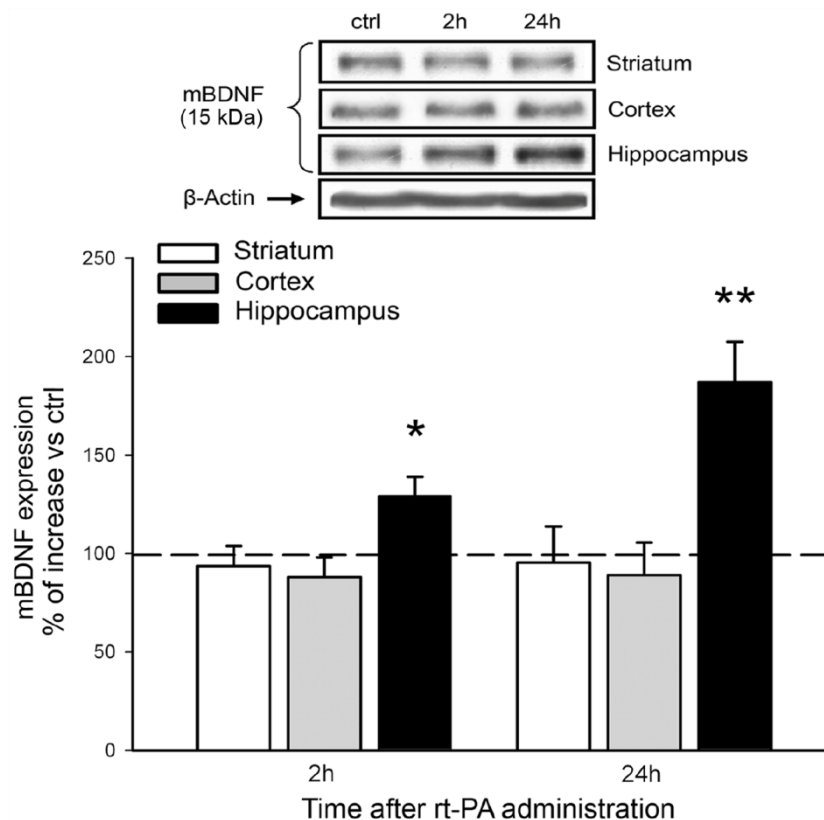


Figure 2. mature BDNF expression in different brain structures. Mature BDNF (mBDNF) expression was assessed 2 h and 24 h after rt-PA or vehicle perfusion in the striatum, cortex and hippocampus. Representative immunoblots are shown and densitometric analysis was performed after normalization of mBDNF expression on β -actin levels. Data are presented as mean \pm SEM and are representative of 10 animals. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared to vehicle-treated animals. doi:10.1371/journal.pone.0092416.g002

Effect of rt-PA and TXA on Plasmin Activity

Plasmin activity was performed in the hippocampus 2 h after administration of rt-PA (10 mg/kg, i.v., $n = 7$), TXA (300 mg/kg, $n = 7$), rt-PA in combination with TXA ($n = 7$) or vehicle ($n = 7$). Plasmin activity in the serum of animals treated by rt-PA was also assessed and used as a positive control. As compared to the major increase in plasmin activity measured in the serum of rt-PA treated animals (+1500%), no variation was detected in the hippocampal homogenates of rats treated either by rt-PA, TXA alone or rt-PA and TXA acid (Figure 4). Of note, plasmin activity in vehicle-treated animals was found very low, barely detectable in the hippocampal tissue as compared to the circulating compartment (1.3 RFU/min/ μ g vs 12.2 RFU/min/ μ g, respectively).

Effect of MK801 on rt-PA-induced Mature BDNF Expression

To assess whether the increase in hippocampal mature BDNF expression induced by rt-PA could be mediated by the potentiation of NMDA receptor signaling, animals received rt-PA in association with MK801 (0.3 or 3 mg/kg, i.p., $n = 5$ and $n = 8$, respectively). Our data revealed that MK801 combined with rt-PA abolished the increase in mature BDNF expression induced by rt-PA administration (Figure 5A). This abrogation was observed at both doses of MK801. Of note, animals treated with MK801 alone, showed no difference in term of mature BDNF expression as compared to vehicle-treated animals (data not shown).

Effect of rt-PA alone or in Association with TXA or MK801 on Pro-BDNF Expression

In order to assess whether rt-PA-induced mature BDNF expression was associated with variations in pro-BDNF expression, Western blotting assessments were performed 2 h and 24 h after drugs administration in the hippocampus. Our results showed that rt-PA alone (Figure 3B and 5B) or in combination with TXA (Figure 3B) or with MK801 (Figure 5B) induced no significant change in pro-BDNF expression as compared to vehicle-treated animals. In addition, TXA or MK801 alone induced no variation in pro-BDNF expression as compared to vehicle-treated animals (data not shown).

Effect of rt-PA alone or in Association with TXA or MK801 on TrkB Receptor Activation

To evaluate whether changes in mature BDNF expression paralleled with changes in TrkB receptor activation, we measured the impact of rt-PA alone or combined with tranexamic acid or MK801 on the ratio of p-TrkB to FL-TrkB levels (Figure 6). Our results showed that the conditions inducing an increase in mature BDNF expression at both 2 h and 24 h were associated with a significant elevation of the p-TrkB/FL-TrkB ratio at 24 h. Indeed, rt-PA-treated animals ($n = 10$) and rt-PA-TXA-treated (30 mg/kg, $n = 5$ and 300 mg/kg, $n = 8$) animals exhibited a significant increase in this ratio as compared to vehicle-treated animals. However, our data revealed that when co-treated with MK801, rt-

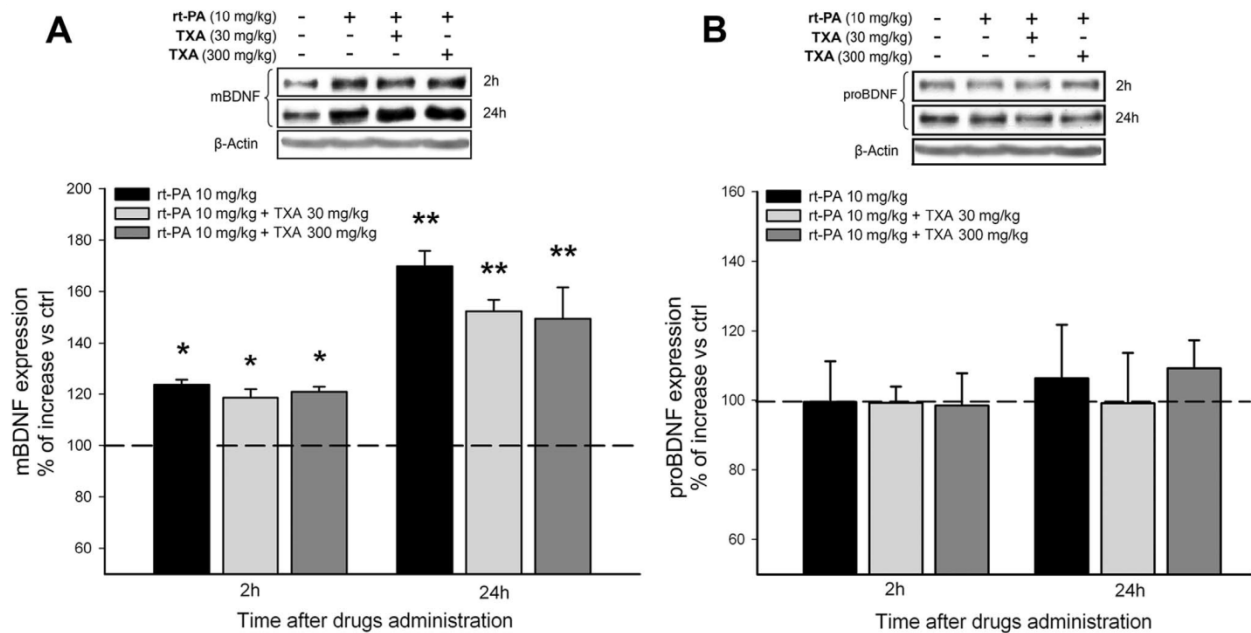


Figure 3. Effect of tranexamic acid on rt-PA-induced increase in mature (A) and proBDNF (B) expressions in the hippocampus. Animals received rt-PA or vehicle perfusion associated or not with tranexamic acid (TXA) (30 or 300 mg/kg). Western blotting assessments were performed 2 h and 24 h after administration of the different treatments. Representative immunoblots are shown and densitometric analysis was performed after normalization of mature BDNF (mBDNF) and proBDNF expressions on β -actin levels. Data are presented as mean \pm SEM and are representative of 5 to 10 animals. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared to vehicle-treated animals. doi:10.1371/journal.pone.0092416.g003

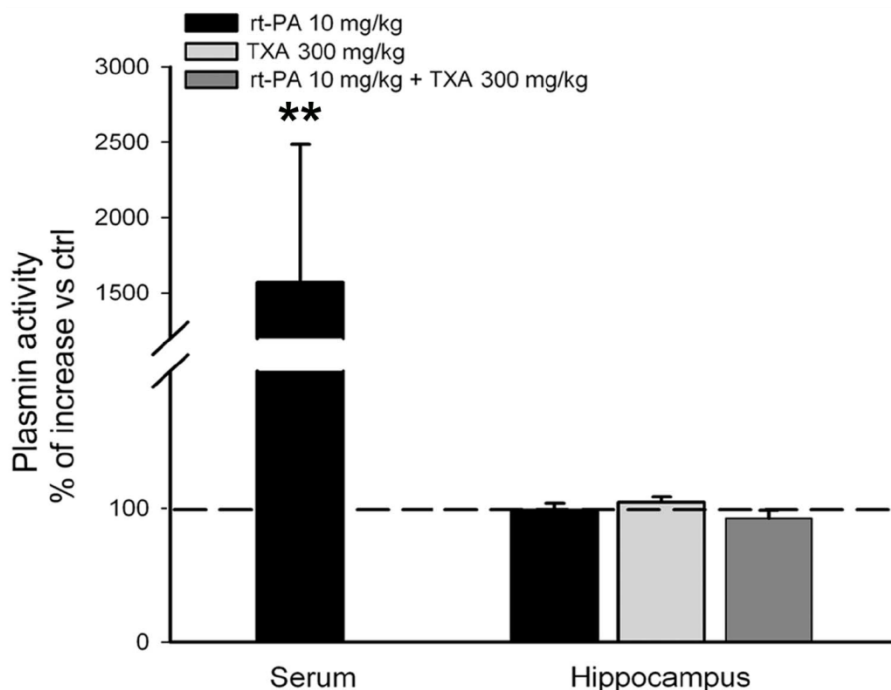


Figure 4. Effect of rt-PA (10 mg/kg) associated or not with tranexamic acid (TXA, 300 mg/kg) on plasmin activity in the serum and the hippocampus. Plasmin activity was assessed 2 h after vehicle or rt-PA perfusion in the serum and 2 h after vehicle, t-PA alone or in association with TXA and TXA alone in the hippocampus. Data are presented as mean \pm SEM and are representative of 7 animals. ** $P < 0.01$ compared to vehicle-treated animals. doi:10.1371/journal.pone.0092416.g004

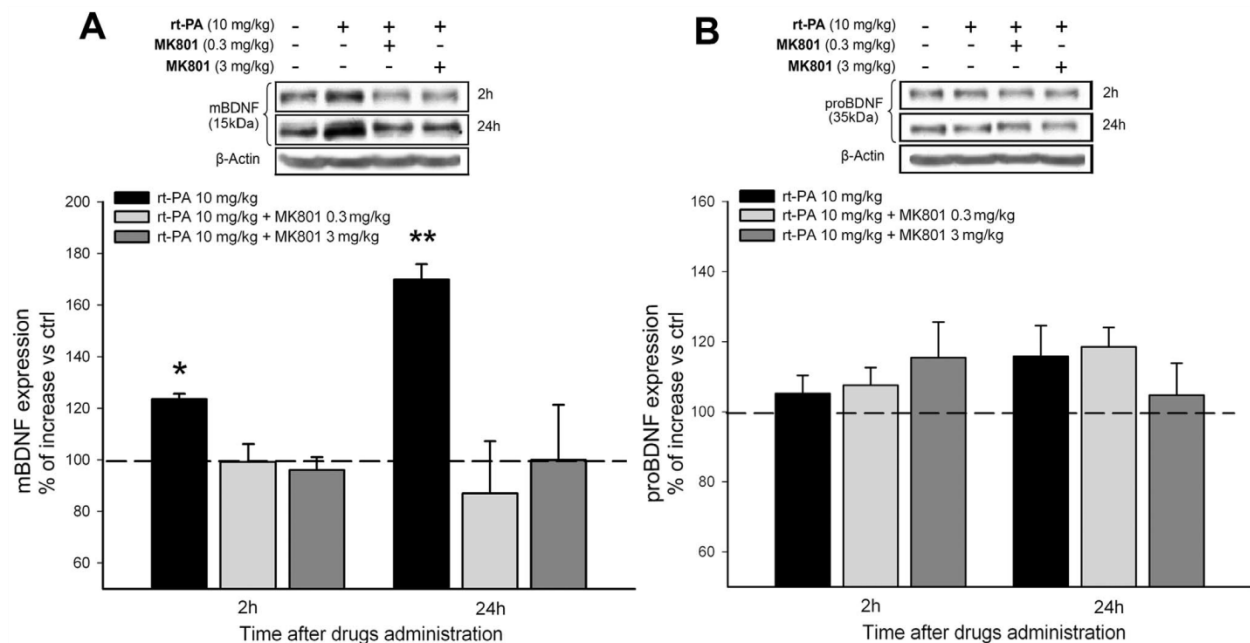


Figure 5. Effect of MK801 on rt-PA-induced increase in mature (A) and proBDNF (B) expressions in the hippocampus. Animals received rt-PA or vehicle perfusion associated or not with MK801 (0.3 or 3 mg/kg). Western blotting assessments were performed 2 h and 24 h after administration of the different treatments. Representative immunoblots are shown and densitometric analysis was performed after normalization of mature BDNF (mBDNF) and proBDNF expressions on β -actin levels. Data are presented as mean \pm SEM and are representative of 5 to 10 animals. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared to vehicle-treated animals. doi:10.1371/journal.pone.0092416.g005

PA-treated animals showed no longer increase in the p-TrkB/FL-TrkB ratio. Of note, MK801 and TXA alone (both doses) induced no change in the p-TrkB/FL-TrkB ratio (data not shown).

Discussion

Regarding the relevance of stimulating BDNF metabolism in various CNS pathologies [26,27], the objective of our study was to assess the effect of exogenous t-PA administration in the maturation of this neurotrophin. For this purpose, we studied the effect of rt-PA on the expression of both pro-BDNF and its mature form and we delineate the mechanistic involved through a pharmacological approach. The present study reveals that i) rt-PA induced a rise in mature BDNF expression and subsequent TrkB receptor activation and that these effects are ii) region-dependent and iii) mediated by NMDAR activation rather than through increase in plasmin activity.

Since the initial *in vitro* demonstration that proteolytic conversion of pro-BDNF to mature BDNF can be achieved by extracellular proteases such as the t-PA/plasmin system [20,28] and that these two BDNF forms have the propensity to produce diametrically opposite effects on neuronal survival and plasticity [11], a particular attention has been paid to the potential relation between t-PA activity and BDNF metabolism. *In vivo*, endogenous brain t-PA activity has been shown to be increased by enriched environment [29,30], electroconvulsive therapy [31] and after physical activity paradigms [32] whereas prenatal restraint stress of rat dams induces decrease in t-PA activity in the offspring of both sexes [33]. Interestingly, a positive link has been established between t-PA activity and mature BDNF levels in these studies, suggesting the implication of t-PA in the maturation of BDNF. Using systemic administration of rt-PA as an original approach to

increase t-PA activity, the present study provides strong arguments for the contribution of t-PA-dependent mechanism in the control of mature BDNF expression. Of note, our results showed that t-PA administration increased significantly t-PA activity only in the hippocampus. Since it has been shown that blood-brain barrier is permeable to t-PA [34] and reported that endogenous content of t-PA inhibitors differ among the different brain structures [35], our data suggest a low level of these inhibitors in the hippocampus.

Recent literature reports that t-PA could act on BDNF metabolism through a plasmin-dependent processing of pro-BDNF to the mature form. Although debated [12], these assertions came initially from *in vitro* studies using neuronal culture. Hence, it has been shown that upon high frequency stimulation, the extracellular cleavage of pro-BDNF was reduced when cultured hippocampal neurons were treated with the membrane impermeable plasminogen activator inhibitor-1 [21]. More recently, the implication of t-PA/plasmin system was also suggested *in vivo*, in studies showing that physical exercise induces a correlation between mature BDNF levels and t-PA gene induction [36] and more strikingly, that 2,7-Bis-(4-Amidinobenzylidene)-Cycloheptan-1-one Dihydrochloride (t-PA STOP) blocks exercise-induced increase in mature BDNF expression [32]. In order to assess whether plasmin activation was implicated in the increase in mature BDNF expression observed in rt-PA-treated animals, we modulated plasmin activity through tranexamic acid, a synthetic lysine analog that shows high affinity to lysine binding sites of plasminogen and plasmin. Using two different doses, when injected in combination with rt-PA, tranexamic acid failed to counteract the rise in mature BDNF expression observed in animals receiving rt-PA alone. Although tranexamic acid induces convulsions in animals [37] and is contraindicated in epileptic patients, the absence of direct arguments for the penetration of this

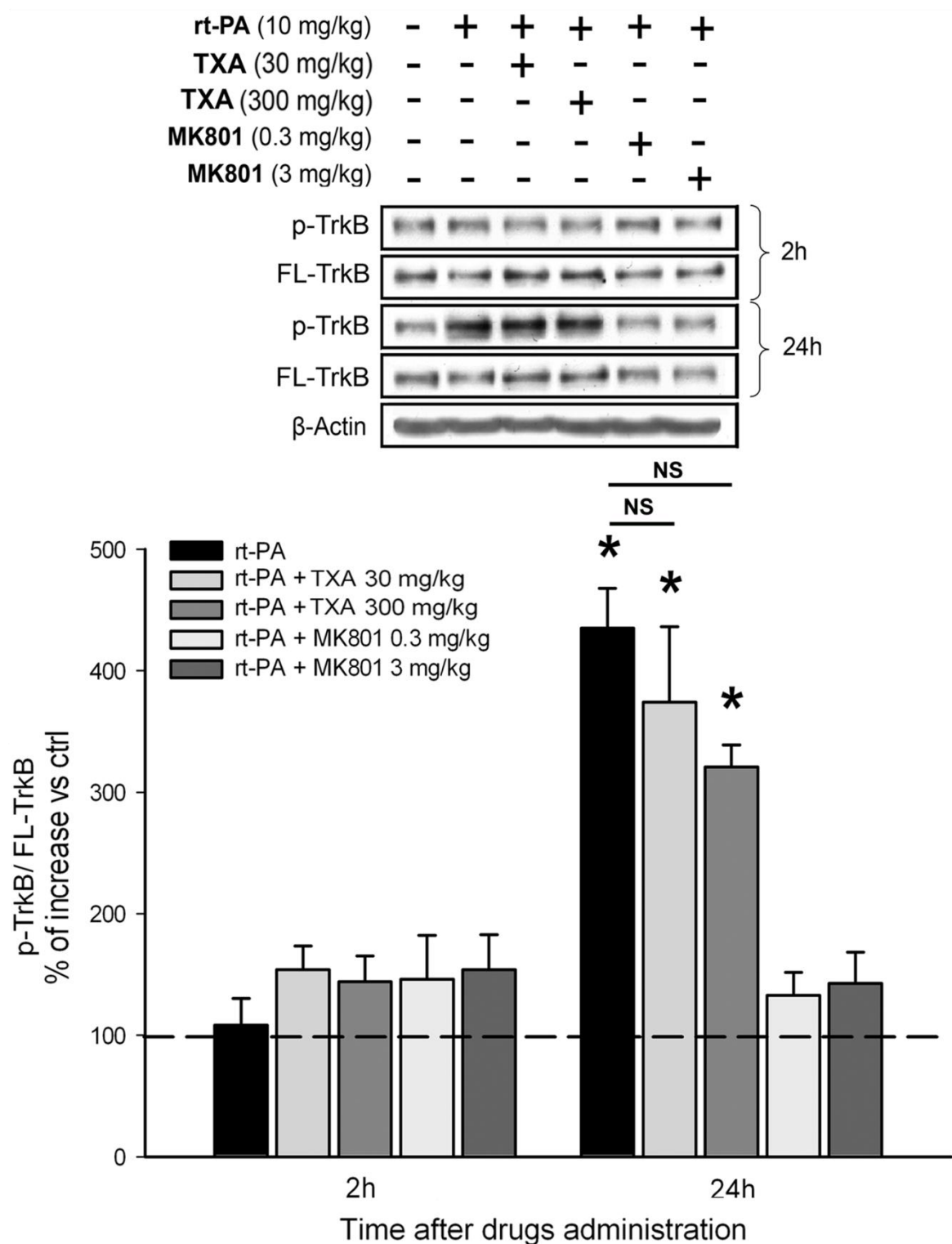


Figure 6. Effect of rt-PA (10 mg/kg) associated or not with tranexamic acid or MK801 on the ratio p-TrkB/FL-TrkB expression. Western blotting assessments were performed 2 h and 24 h after administration of the different treatments. Representative immunoblots are shown and ratio was calculated after normalization of p-TrkB and FL-TrkB expressions on β -actin levels. Data are presented as mean \pm SEM and are representative of 5 to 10 animals. * $P < 0.05$ compared to vehicle-treated animals. NS = non-significant. doi:10.1371/journal.pone.0092416.g006

compound from blood to brain could explain this observed lack of effects. In order to clarify these data, we measured through specific enzymatic assay, hippocampal plasmin activity in control animals and in animals treated by rt-PA alone or in association with tranexamic acid. As compared to vehicle-treated animals, rt-PA induced no increase in plasmin activity in the hippocampal tissues despite a major rise in the circulating compartment. In addition, in the hippocampal area, basal plasmin activity was found barely detectable suggesting that plasmin activity is locally controlled to avoid a deleterious extracellular proteolysis. In line with this assumption, several studies have reported that the principal physiological plasmin inhibitor, the α_2 -antiplasmin, is highly expressed in rodent hippocampus [38,39]. Besides, it has been shown that the t-PA substrate plasminogen is localized intracellularly, mainly in the neuronal somata of the CA3 and CA1 layers [40]. Overall data suggest that rt-PA-induced increase in hippocampal mature BDNF expression is a plasmin-independent mechanism.

As stated in the introduction, t-PA effect is not restricted to plasmin-dependent mechanisms. Among its different functions, t-PA is now considered as a neuromodulator of glutamatergic signaling mediated by NMDARs. Indeed, t-PA has been shown to interact with NMDAR subunits such as GluN1, GluN2B and GluN2D with several potential mechanisms [14,15]. Thus, it has been reported that t-PA could increase NMDAR calcium permeability through proteolytic cleavage of the amino terminal domain of the GluN1 subunit [41,42]. In addition, the interaction between t-PA and GluN2B subunit has been reported in the setting of alcoholism leading to an upregulation of GluN2B-containing NMDA receptors [43] while more recently, a preferential activation with GluN2D subunit-containing NMDA receptors influencing spatial memory has also been evidenced [44]. Besides, t-PA might modulate indirectly NMDA-evoked current through its ability to signal via LRP-1, a membrane receptor tethered to NMDARs by the intracellular scaffold protein, PSD-95 [45]. Regarding the potential multi-subunit interactions of t-PA with NMDAR, we choose the non-subunit-specific NMDAR antagonist MK-801 to assess whether the increase in mature BDNF expression observed in rt-PA-treated animals could be mediated by NMDAR activation. When injected just after the beginning of rt-PA perfusion, both doses of MK801 completely negated the rise in mature BDNF expression induced by rt-PA, strongly suggesting that the increase in hippocampal mature BDNF expression is mediated by a rt-PA impact on NMDAR signaling. Regarding the mechanism potentially involved, it can be suggested that calcium influx induced by NMDAR activation could induce BDNF gene expression as suggested by a study showing in rats that exercise-induced increase in hippocampal BDNF mRNA levels is completely prevented by NMDAR blockade [46] and/or that NMDAR activation could impinge activity-dependent secretion of mature BDNF [47]. According to the evolution of pro-BDNF expression that was found stable over the different time points despite an increase in the mature form, our data could support the idea that rt-PA-induced increase in mature BDNF expression results from the processing of pro-BDNF associated with its continuous synthesis. In addition, although the precise interactions of rt-PA with the different NMDAR subunits are not investigated here, it is conceivable to hypothesize that the confinement of rt-PA-induced increase in mature BDNF expression to the hippocampus could be

due to the specific composition in NMDAR subunits of this brain structure [48,49]. This hypothesis is in line with a study showing that rt-PA incubation increased survival in hippocampal but not in cortical neurons exposed to oxygen-glucose deprivation [50]. Finally, as compared to *in vivo* studies concluding on the involvement of the t-PA/plasmin by showing that t-PA STOP blocked exercise-induced mature BDNF expression [32], our results could lead to a reinterpretation. Indeed, it is important to notice that t-PA STOP has also been shown to attenuate t-PA-dependent potentiation of NMDA-induced calcium influx [51].

By virtue of its essential role in development, neuronal health and plasticity, BDNF deregulation has been implicated in many psychiatric disorders [27]. In addition, regarding its contribution to post-stroke neuroplastic changes [8,10], strategies aiming at upregulating mature BDNF levels or mimicking BDNF signaling may offer clinically relevant therapeutics. In the present study, we also analyzed whether the rise in mature BDNF observed in rt-PA-treated animals was associated with the activation of its high affinity receptor TrkB by assessing the phosphorylation state of this receptor. Our data revealed that the increase in mature BDNF levels after rt-PA treatment was associated with TrkB receptor activation. In addition, a causative link between mature BDNF expression and TrkB receptor phosphorylation was suggested since MK801 but not tranexamic acid, abolished TrkB receptor activation. According to the fact that BDNF binding to TrkB receptors elicits several intracellular signaling cascades that mainly impact neuronal outcome positively [52], t-PA administration or interventions aimed at increasing t-PA activity such as physical exercise [32] could represent an interesting strategy in various neurological and psychiatric disorders associated with low level of BDNF and/or requiring an overproduction of this neurotrophin. Besides, since rt-PA-induced increase in mature BDNF and subsequent TrkB receptor activation occurred only in the hippocampus, it can be hypothesized that exogenous t-PA could impact activity-dependent synaptic modifications and induce neurogenesis and improve memory formation in this structure. Lastly, strategies aimed at increasing t-PA activity could be specially relevant in humans carrying val66met polymorphism that are suspected to have a reduced activity-dependent BDNF secretion and are subjected to impaired episodic memory function [27] and are at risk for psychiatric diseases [53].

In conclusion, the present study strongly suggests that exogenous t-PA induces increase in hippocampal mature BDNF expression through NMDAR activation. Although our results do not presage the mechanisms that would be implicated in pathophysiological situations such as stroke in which t-PA has also been reported to potentiate NMDAR signaling to an excitotoxic threshold [48,54], overall results may underlie a possible beneficial, structure-dependent and extra-fibrinolytic effect of exogenous t-PA. Since rt-PA is the only approved treatment of thromboembolic stroke, the potential occurrence of similar mechanisms in experimental stroke models warrants future studies.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MR APT C. Marie PG. Performed the experiments: MR C. Mossiat PG. Analyzed the data: MR APT YB AJ C. Marie PG. Wrote the paper: MR C. Marie PG.

References

- Cohen-Cory S, Kidane AH, Shirkey NJ, Marshak S (2010) Brain-derived neurotrophic factor and the development of structural neuronal connectivity. *Dev Neurobiol* 70: 271–288.
- Park H, Poo MM (2013) Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat Rev Neurosci* 14: 7–23.
- Horch HW, Katz LC (2002) BDNF release from single cells elicits local dendritic growth in nearby neurons. *Nat Neurosci* 5: 1177–1184.
- Tanaka J, Horiike Y, Matsuzaki M, Miyazaki T, Ellis-Davies GC, et al. (2008) Protein synthesis and neurotrophin-dependent structural plasticity of single dendritic spines. *Science* 319: 1683–1687.
- McAllister AK, Lo DC, Katz LC (1995) Neurotrophins regulate dendritic growth in developing visual cortex. *Neuron* 15: 791–803.
- Patterson SL, Abel T, Deuel TA, Martin KC, Rose JC, et al. (1996) Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. *Neuron* 16: 1137–1145.
- Waterhouse EG, Xu B (2009) New insights into the role of brain-derived neurotrophic factor in synaptic plasticity. *Mol Cell Neurosci* 42: 81–89.
- Cowansage KK, LeDoux JE, Monfils MH (2010) Brain-derived neurotrophic factor: a dynamic gatekeeper of neural plasticity. *Curr Mol Pharmacol* 3: 12–29.
- Mattson MP (2008) Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. *Ann N Y Acad Sci* 1144: 97–112.
- Lipsky RH, Marini AM (2007) Brain-derived neurotrophic factor in neuronal survival and behavior-related plasticity. *Ann N Y Acad Sci* 1122: 130–143.
- Lu B, Pang PT, Woo NH (2005) The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci* 6: 603–614.
- Barker PA (2009) Whither proBDNF? *Nat Neurosci* 12: 105–106.
- Greenberg ME, Xu B, Lu B, Hempstead BL (2009) New insights in the biology of BDNF synthesis and release: implications in CNS function. *J Neurosci* 29: 12764–12767.
- Samson AL, Medcalf RL (2006) Tissue-type plasminogen activator: a multifaceted modulator of neurotransmission and synaptic plasticity. *Neuron* 50: 673–678.
- Yepes M, Roussel BD, Ali C, Vivien D (2009) Tissue-type plasminogen activator in the ischemic brain: more than a thrombolytic. *Trends Neurosci* 32: 48–55.
- Huang YY, Bach ME, Lipp HP, Zhuo M, Wolfer DP, et al. (1996) Mice lacking the gene encoding tissue-type plasminogen activator show a selective interference with late-phase long-term potentiation in both Schaffer collateral and mossy fiber pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 8699–8704.
- Madani R, Hulo S, Toni N, Madani H, Steimer T, et al. (1999) Enhanced hippocampal long-term potentiation and learning by increased neuronal expression of tissue-type plasminogen activator in transgenic mice. *EMBO J* 18: 3007–3012.
- Zhuo M, Holtzman DM, Li Y, Osaka H, DeMaro J, et al. (2000) Role of tissue plasminogen activator receptor LRP in hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci* 20: 542–549.
- Chen ZL, Strickland S (1997) Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin. *Cell* 91: 917–925.
- Pang PT, Teng HK, Zaitsev E, Woo NT, Sakata K, et al. (2004) Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science* 306: 487–491.
- Nagappan G, Zaitsev E, Senatorov VV Jr, Yang J, Hempstead BL, et al. (2009) Control of extracellular cleavage of ProBDNF by high frequency neuronal activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 1267–1272.
- Anderson CM, Norquist BA, Vesce S, Nicholls DG, Soine WH, et al. (2002) Barbiturates induce mitochondrial depolarization and potentiate excitotoxic neuronal death. *J Neurosci* 22: 9203–9209.
- Kotermanski SE, Johnson JW, Thiels E (2013) Comparison of behavioral effects of the NMDA receptor channel blockers memantine and ketamine in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 109: 67–76.
- Quirie A, Hervieu M, Garnier P, Demougeot C, Mossiat C, et al. (2012) Comparative effect of treadmill exercise on mature BDNF production in control versus stroke rats. *PLoS One* 7: e44218.
- Madinier A, Bertrand N, Rodier M, Quirie A, Mossiat C, et al. (2013) Ipsilateral versus contralateral spontaneous post-stroke neuroplastic changes: involvement of BDNF? *Neuroscience* 231: 169–181.
- Binder DK, Scharfman HE (2004) Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors* 22: 123–131.
- Autry AE, Monteggia LM (2012) Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. *Pharmacol Rev* 64: 238–258.
- Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL (2001) Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294: 1945–1948.
- Hori-Hayashi N, Yoshikawa M, Matsusue Y, Ishizaka S, Nishi M, et al. (2011) Environmental stimulation changes tissue-type plasminogen activator activity in the adult mouse hippocampus. *Neurochem Int* 58: 1–4.
- Obiang P, Maubert E, Bardou I, Nicole O, Launay S, et al. (2011) Enriched housing reverses age-associated impairment of cognitive functions and tPA-dependent maturation of BDNF. *Neurobiol Learn Mem* 96: 121–129.
- Segawa M, Morinobu S, Matsumoto T, Fuchikami M, Yamawaki S (2013) Electroconvulsive seizure, but not imipramine, rapidly up-regulates pro-BDNF and t-PA, leading to mature BDNF production, in the rat hippocampus. *Int J Neuropsychopharmacol* 16: 339–350.
- Ding Q, Ying Z, Gomez-Pinilla F (2011) Exercise influences hippocampal plasticity by modulating brain-derived neurotrophic factor processing. *Neuroscience* 192: 773–780.
- Yeh CM, Huang CC, Hsu KS (2012) Prenatal stress alters hippocampal synaptic plasticity in young rat offspring through preventing the proteolytic conversion of pro-brain-derived neurotrophic factor (BDNF) to mature BDNF. *J Physiol* 590: 991–1010.
- Benchenane K, Berezowski V, Ali C, Fernandez-Monreal M, Lopez-Atalaya JP, et al. (2005) Tissue-type plasminogen activator crosses the intact blood-brain barrier by low-density lipoprotein receptor-related protein-mediated transcytosis. *Circulation* 111: 2241–2249.
- Vivien D, Buisson A (2000) Serine protease inhibitors: novel therapeutic targets for stroke? *J Cereb Blood Flow Metab* 20: 755–764.
- Sartori CR, Vieira AS, Ferrari EM, Langone F, Tongiorgi E, et al. (2011) The antidepressant effect of the physical exercise correlates with increased levels of mature BDNF, and proBDNF proteolytic cleavage-related genes, p11 and tPA. *Neuroscience* 180: 9–18.
- Furtmüller R, Schlag MG, Berger M, Hopf R, Huck S, et al. (2002) Tranexamic acid, a widely used antifibrinolytic agent, causes convulsions by a gamma-aminobutyric acid(A) receptor antagonistic effect. *J Pharmacol Exp Ther* 301: 168–173.
- Menoud PA, Sappino N, Boudal-Khoshbeen M, Vassalli JD, Sappino AP (1996) The kidney is a major site of alpha(2)-antiplasmin production. *J Clin Invest* 97: 2478–2484.
- Kawashita E, Kanno Y, Asayama H, Okada K, Ueshima S, et al. (2013) Involvement of alpha2-antiplasmin in dendritic growth of hippocampal neurons. *J Neurochem* 126: 58–69.
- Taniguchi Y, Inoue N, Morita S, Nikaido Y, Nakashima T, et al. (2011) Localization of plasminogen in mouse hippocampus, cerebral cortex, and hypothalamus. *Cell Tissue Res* 343: 303–317.
- Nicole O, Docagne F, Ali C, Margaill I, Carmeliet P, et al. (2001) The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat Med* 7: 59–64.
- Benchenane K, Castel H, Boulouard M, Bluthé R, Fernandez-Monreal M, et al. (2007) Anti-NR1 N-terminal-domain vaccination unmasks the crucial action of tPA on NMDA-receptor-mediated toxicity and spatial memory. *J Cell Sci* 120: 578–585.
- Pawlak R, Melchor JP, Matys T, Skrzypiec AE, Strickland S (2005) Ethanol-withdrawal seizures are controlled by tissue plasminogen activator via modulation of NR2B-containing NMDA receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 443–448.
- Obiang P, Macrez R, Jullienne A, Bertrand T, Lesept F, et al. (2012) GluN2D subunit-containing NMDA receptors control tissue plasminogen activator-mediated spatial memory. *J Neurosci* 32: 12726–12734.
- Martin AM, Kuhlmann C, Trossbach S, Jaeger S, Waldron E, et al. (2008) The functional role of the second NPXY motif of the LRP1 beta-chain in tissue-type plasminogen activator-mediated activation of N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem* 283: 12004–12013.
- Vaynman S, Ying Z, Gomez-Pinilla F (2003) Interplay between brain-derived neurotrophic factor and signal transduction modulators in the regulation of the effects of exercise on synaptic-plasticity. *Neuroscience* 122: 647–657.
- Kolarow R, Brigadski T, Lessmann V (2007) Postsynaptic secretion of BDNF and NT-3 from hippocampal neurons depends on calcium calmodulin kinase II signaling and proceeds via delayed fusion pore opening. *J Neurosci* 27: 10350–10364.
- Baron A, Montagne A, Casse F, Launay S, Maubert E, et al. (2010) NR2D-containing NMDA receptors mediate tissue plasminogen activator-promoted neuronal excitotoxicity. *Cell Death Differ* 17: 860–871.
- Paoletti P, Bellone C, Zhou Q (2013) NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* 14: 383–400.
- Echeverry R, Wu J, Haile WB, Guzman J, Yepes M (2010) Tissue-type plasminogen activator is a neuroprotectant in the mouse hippocampus. *J Clin Invest* 120: 2194–2205.
- Liot G, Benchenane K, Leveille F, Lopez-Atalaya JP, Fernandez-Monreal M, et al. (2004) 2,7-Bis-(4-aminobenzylidene)-cycloheptan-1-one dihydrochloride, tPA stop, prevents tPA-enhanced excitotoxicity both in vitro and in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab* 24: 1153–1159.
- Reichardt LF (2006) Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361: 1545–1564.
- Aas M, Haukvik UK, Djurovic S, Bergmann O, Athanasius L, et al. (2013) BDNF val66met modulates the association between childhood trauma, cognitive and brain abnormalities in psychoses. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 46: 181–188.
- Parcq J, Bertrand T, Montagne A, Baron AF, Macrez R, et al. (2012) Unveiling an exceptional zymogen: the single-chain form of tPA is a selective activator of NMDA receptor-dependent signaling and neurotoxicity. *Cell Death Differ* 19: 1983–1991.

II. Etude 2 : Effet de l'administration de t-PA sur les taux circulants de BDNF. Etude chez l'Homme et chez le Rat.

Titre :

Effect of t-PA administration on post-stroke circulating BDNF levels.

From bench to bedside.

Auteurs :

Marion Rodier, Aurore Quirié, Anne Prigent-Tessier, Yannick Béjot, Agnès Jacquin, Claude Mossiat, Christine Marie and Philippe Garnier.

Journal :

Neuroscience ; NSC-14-1340

(soumis le 3 septembre 2014)

A. Contexte et objectifs

Le BDNF est présent dans le sang mais en faible quantité, la majorité étant présente dans les plaquettes. Alors que l'origine cellulaire du BDNF présent dans le sang reste hypothétique, les neurologues et les psychiatres admettent cependant que les taux circulants de BDNF sont un reflet de la santé cérébrale alors que les cardiologues ont récemment proposé qu'ils puissent également être un reflet de la santé cardiovasculaire.

Peu d'études se sont consacrées aux effets de l'AVC sur les taux circulants de BDNF et l'impact de la fibrinolyse sur ces taux n'est pas connu.

Dans ce contexte, le premier objectif de notre travail a été d'étudier l'impact de l'administration de rt-PA sur les taux circulants de BDNF chez des patients admis au CHU de Dijon pour un AVC ischémique et chez des rats soumis à une ischémie focale. Le second objectif a été d'évaluer dans quelle mesure le BDNF circulant pouvait être utilisé comme un marqueur prédictif de l'amélioration post-AVC chez le patient

B. Méthodes

Nous avons réalisé une étude prospective longitudinale, monocentrique, incluant les patients hospitalisés pour un AVC ischémique aux urgences neurovasculaires (UNV) du centre hospitalier universitaire (CHU) de Dijon entre novembre 2010 et avril 2012, et traités ou non par rt-PA. Pour chaque patient inclus, 4 prélèvements de sang ont été réalisés à J0 (avant la fibrinolyse), à J1, J7 et J90, à partir desquels le BDNF a été dosé et l'activité t-PA a été mesurée. Les corrélations potentielles entre les taux de BDNF, l'activité t-PA, la récupération fonctionnelle et le score cardiovasculaire (SCV) des patients, ont été recherchées.

En parallèle, des rats ont été soumis à une ischémie focale par photothrombose et ont été perfusés par le véhicule (L-arginine 3,5% dans de l'eau ultra-pure) ou par rt-PA à la dose de 10 mg/kg i.v. Chaque animal a alors subi 4 prélèvements de sang : avant l'ischémie, et à 1h, 4 h et 24h après l'ischémie. Comme pour l'étude chez l'Homme, le BDNF sérique ainsi que l'activité t-PA ont été dosés.

C. Principaux résultats

- ✓ Les taux sériques de BDNF sont plus élevés chez les patients fibrinolyés par rapport aux non fibrinolyés à J1 et J7.
- ✓ Les taux de BDNF sont corrélés à l'activité t-PA à J1, aucune corrélation n'étant retrouvée aux autres temps.
- ✓ Les patients fibrinolyés présentent une meilleure récupération fonctionnelle que les patients non fibrinolyés
- ✓ La récupération fonctionnelle n'est pas corrélée aux taux sériques de BDNF.
- ✓ Les taux sériques de BDNF sont négativement corrélés au SCV des patients.
- ✓ Chez le Rat, les taux de BDNF ne sont pas différents chez les animaux traités et non traités par rt-PA, et aucune corrélation n'a été observée entre l'activité t-PA et les taux de BDNF.

Marion Rodier^{1,2,4}, Aurore Quiré^{1,2,3}, Anne Prigent-Tessier^{1,2}, Yannick Béjot^{4,5}, Agnès Jacquin^{4,5}, Claude Mossiat^{1,2}, Christine Marie^{1,2} and Philippe Garnier^{1,2,3}.

Title : Effect of t-PA administration on post-stroke circulating BDNF levels. From bench to bedside.

¹ Unité INSERM U1093 Cognition, Action et Plasticité Sensorimotrice, Dijon F-21078 France

² Université de Bourgogne, Dijon F-21079 France

³ Département Génie Biologique, IUT, Dijon F-21078 France

⁴ Department of Neurology, University Hospital, Dijon F-21000 France

⁵ Centre d'Epidémiologie des Populations, EA4184, Dijon F-21000 France

Correspondence to:

Dr. Philippe Garnier

Laboratoire INSERM U1093 Cognition, Action et Plasticité Sensorimotrice

Faculté de Pharmacie

7 Boulevard Jeanne d'Arc, BP 87900

21033 DIJON CEDEX, France

Phone: +33 (0)3 80 39 34 94

Fax: +33 (0)3 80 39 32 27

e-mail: pgarnier@u-bourgogne.fr

Abbreviations: BDNF, Brain-Derived Neurotrophic Factor; rt-PA, Recombinant Tissue Plasminogen Activator ; NIHSS, National Institute of Health Stroke Scale; ESC, European Society of Cardiology.

Abstract

The recombinant form of tissue plasminogen activator (rt-PA) is the only curative treatment of ischemic stroke. Recently, t-PA has been linked to the metabolism of Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), a major neurotrophin involved in post-stroke neuroprotection and neuroplasticity. Thus, the objective of our study was to investigate the impact of rt-PA administration on post-stroke circulating BDNF levels in humans and in animals. Serum BDNF levels, t-PA activity were measured at the admission and up to 3 months in 40 stroke patients receiving or not rt-PA perfusion. Potential correlations between serum BDNF, t-PA activity, cardiovascular and neurological scores were investigated. In parallel, serum BDNF levels and t-PA activity have been assessed before and after (1, 4 and 24h) the induction of photothrombotic cerebral ischemia in rats. Our study reveals that rt-PA administration was associated with increase in serum BDNF levels in patients at day 1 and day 7 after stroke onset and with a greater reduction in NIHSS score. Serum BDNF levels were correlated to serum t-PA activity at day 1 but were not correlated to NIHSS score reduction. Besides, a negative correlation was identified between serum BDNF levels and the cardiovascular score at the admission and day 90. In animals, no variation was measured in post-stroke serum BDNF levels between rt-PA- and vehicle-treated animals and no correlation was found between serum BDNF levels and t-PA activity. According to the absence of correlation between serum BDNF and neurological improvement and the observed bench-to-bedside discrepancy, overall data suggest that serum BDNF may not have utility as a predictive biomarker of stroke outcome. Alternatively, our data identifying association between post-stroke serum BDNF levels and cardiovascular health status suggest that circulating BDNF is rather reflecting endothelial dysfunction.

Key words: Stroke, circulating BDNF, fibrinolysis, rt-PA, functional recovery, cardiovascular health.

Despite intensive preclinical researches that have allowed a better characterization of the complex pathogenesis of stroke, the only available curative care for stroke patients is the recombinant form of the tissue plasminogen activator (rt-PA). According to its primary function, rt-PA converts fibrin-bound plasminogen into active plasmin, that in turn dissolves the fibrin of blood clots, achieving arterial recanalization in acute ischemic stroke. However, considerable experimental evidences have depicted that beyond its fibrinolytic function, t-PA is a molecule implicated in many different mechanisms (Yepes et al., 2009). In physiological conditions, t-PA is involved in neuronal migration and synaptic outgrowth during development while in the adult brain, t-PA is implicated in neurotransmission, synaptic plasticity and different cognitive functions (Carmeliet et al., 1994, Huang et al., 1996, Baranes et al., 1998). In addition, experimental studies have revealed that t-PA could have adverse effects and acts as pro-hemorrhagic, pro-inflammatory and pro-excitotoxic factor in pathological conditions (Lemarchant et al., 2012). This pleiotropy can be explained by a direct or indirect (plasmin) proteolytic action but also by the ability of this protease to cross the blood brain barrier (Benchenane et al., 2005) and to establish several interactions with numerous receptors expressed by the different cells of the neurovascular unit (Vivien et al., 2011). Recently, a particular attention has been paid to the potential relation between t-PA (either endogenous or exogenous) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) metabolism (Pang et al., 2004, Nagappan et al., 2009), a crucial molecule involved in brain development, functioning, survival, repair and plasticity. Indeed, it has been established in one hand that t-PA through plasmin activation is involved in BDNF activation whereas in the other hand increase in hippocampal mature BDNF expression through NMDA receptor activation has been recently demonstrated (Rodier et al., 2014).

BDNF is present in the blood (Rosenfeld et al., 1995) and circulating BDNF is largely used as an indicator of the levels of BDNF present in the brain by neurologists and psychologists (Dwivedi, 2013, Munkholm et al., 2014). Thus, the measurement of circulating BDNF appears to be of great interest for diagnosis, prognostic and treatment monitoring of several neurological pathologies. Surprisingly, the effect of stroke on circulating BDNF has been poorly investigated. Plasma BDNF levels were found not modified in the acute phase of stroke (Di Lazzaro et al., 2007) and decreased levels both in the early and chronic stages

were observed in stroke patients with depression as compared to stroke patients without depression (Yang et al., 2011).

In this context, the objective of our study was to investigate the impact of rt-PA administration on circulating BDNF levels in stroke. Serum BDNF levels, t-PA activity were measured in stroke patients receiving or not rt-PA perfusion on admission and up to 3 months after stroke onset and potential correlations between serum BDNF, t-PA activity, cardiovascular and neurological scores were investigated. In parallel, serum BDNF levels and t-PA activity have been assessed before and after (1, 4 and 24h) the induction of cerebral ischemia in rats. These results may help to evaluate the pertinence of circulating BDNF as a prognostic marker in stroke patients.

1. Experimental procedures

1.1. Subjects, material and methods

1.1.1. Setting, standard protocol approval, registrations and patients consents.

This prospective longitudinal study was conducted in Dijon University Hospital, from September 2010 to April 2012, and recruited adults of both genders who were admitted in the neurovascular emergency department for ischemic stroke and treated or not with intravenous (i.v.) rt-PA (0.9 mg/kg, Actilyse, Boehringer Ingelheim). The patients gave informed consent themselves or by close relative. The study was approved by health authorities and relevant ethical committee: Comité de Protection des Personnes (CPP) Nord Est I Dijon, France, by 11-18-2010, under registration number 2010-A01181-38.

1.1.2. Inclusion and non inclusion criteria.

Patients over 18 years with a National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS) score between 4 and 25 who were admitted in Dijon University Hospital for an ischemic stroke started less than 12h before the admission and consent for participation were eligible. Non inclusion criteria were (1) hemorrhagic stroke, (2) transient ischemic attack (TIA), (3) aphasia before and at the time of stroke, (4) prior dementia (5) impairment of daily living before stroke onset with a pre-stroke modified Rankin Scale score > 4 and (6) pregnancy.

1.1.3. Blood samples.

Each patient underwent four blood samples. The first blood sample (D0) was performed after consent and before rt-PA treatment for the fibrinolyzed patients (FP). The second and third samples were obtained at 8 am the next day (D1) and the seventh (D7) day after admission, respectively. The last sample (D90) was collected during the inspection visit, about 90 days after admission.

1.1.4. Clinical assessment.

The demographical data (gender and age), the lesion localization and the conventional vascular risk factors (hypertension, diabetes, hypercholesterolemia, smoking habit and alcohol abuse) were obtained. The etiology of stroke was classified using TOAST (Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment) criteria. Stroke severity was assessed on admission and at 1, 7 and 90 days after stroke onset using the NIHSS score by a neurologist. The cardiovascular health status was assessed using the European Society of Cardiology (ESC) scale (<http://www.escardio.org/communities/EACPR/toolbox/health-professionals/Pages/SCORE-Risk-Charts.aspx>). This scale is based on gender, age, total cholesterol, systolic blood pressure and smoking status. Of note, the cardiovascular score was calculated using the systolic blood pressure measured at the patient admission. Consequently, the score was overestimated, however no difference in serum BDNF levels was observed between patients having a high (>160 mm Hg) and a low (<160 mm Hg) systolic blood pressure (Figure 1).

1.1.5. Study issues.

The primary endpoint is based on measurement of serum BDNF carried out from venous blood samples (1) at different times. Secondary endpoints were t-PA activity in serum at different time (2), the number of platelets in the different groups of patients (3), the functional recovery evaluated by NIHSS score (4) and cardiovascular health status by the ESC score (5).

1.2. Preclinical study

1.2.1. Animals.

The experiments were carried out on adult male Wistar rats (290–310 g; Janvier Labs, Saint Berthevin, France, n = 16) and were conducted according to the French Department of Agriculture guidelines (license 21CAE099). The animals were housed five per cage and kept under 12/12h light/dark cycle and allowed *ad libitum* access to food and water. The experimental procedures were approved by the local committee for ethic in animal experimentation (agreement 6112). All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used. Body and head temperatures were monitored and controlled during surgical procedure. The choice of doses and route of drug administration have been made in agreement with the literature. All treated animals have been included in this study. In order to minimize the impact of circadian cycle, animals were homogeneously allocated in each group with respect to the time of day at which the injection occurred.

1.2.2. Ischemic stroke model.

Rats were subjected to a permanent focal ischemia induced by photothrombotic cortical occlusion as previously described (Madinier et al., 2013). Briefly, anesthesia was induced by intraperitoneal (i.p.) injection of chloral hydrate (400 mg/kg). Then, anesthetized rats were infused for 20s with the photosensitizer dye rose bengal (20 mg/kg, i.v.) and a laser beam was focused with an optic fiber (1 mm internal diameter, emerging power 90 mW) through the skull on the right hemisphere (-0.5 mm posterior and 3.5 mm right lateral relative to the bregma). The laser system is a diode-pumped solid-state laser (LCS-DLT-312, Opton Laser International, Orsay, France) working at 532 nm. The skull was irradiated for 5 min, the irradiation beginning 30s before the dye injection. Using this site of irradiation, infarction was confined to the motor cortex (Millerot-Serruot et al., 2007). Twenty-four hours following ischemia, the animals were anesthetized by i.p. injection of chloral hydrate (400 mg/kg) and euthanized.

1.2.3. Pharmacological treatment.

After ischemia, animals were perfused with vehicle (L-Arginin 3.5% in deionized water, n=8) or rt-PA (Actilyse, Boehringer Ingelheim) 10 mg/kg i.v. (undialyzed, n=8) as a bolus (10 % of

total dose) followed by a 60 min perfusion (90% of total dose) using pump infusion (Harvard Apparatus, 55-4150) to mimic the clinical protocol of rt-PA administration.

1.2.4. Blood samples.

Each rat underwent four blood samples obtained by venous puncture of the left jugular vein. The blood samples were performed before and after (1, 4 and 24h) photothrombotic occlusion. The first, second and last samples were carried out after anesthesia by i.p. injection of chloral hydrate (400 mg/kg), but the third was collected under short-term halothane anesthesia in order to reduce the overall duration of the anesthesia.

1.3. Biochemical measurement

1.3.1. BDNF measurement.

BDNF levels were determined with a commercial sandwich ELISA kit (ChemiKine™, MERCK MILLIPORE). For this kit, rabbit polyclonal antibodies that were coated onto plates were generated against human BDNF and the captured BDNF were detected using biotin conjugated mouse monoclonal antibodies. BDNF antibodies do not cross with NGF, NT 4/5 or NT3. The limit of sensitivity was 6 pg/mL. The experimental procedure was performed according to the manufacturer's instructions. Serum samples were diluted (1/10, v/v) in TRIS buffer (pH 7.4). The diluted samples (50 µL) were again diluted (1/2, v/v) directly on the plate in a buffer provided by the kit. All assays were performed in duplicate. Circulating BDNF levels were expressed as ng/mL.

1.3.2. t-PA activity Assay.

t-PA activity was measured using Sensolyte® AMC t-PA Activity Assay (Anaspec, TEBU Bio, Le Perray-en-Yvelines, France) according to the manufacturer's protocol. Briefly, 50 µl of fluorimetric substrate was incubated with 50 µl of serum diluted (1/50, v/v) in saline. Measurements were performed in duplicate at 30°C over a 60 min period using multiplate reader (Wallac Victor² 1420 Multilabel Counter). Relative fluorescent unit (RFU) per min were normalized by protein concentration.

1.3.3. Statistical analysis.

The results are expressed as means \pm standard error of the mean (SEM). All statistical analysis was performed using systat 9.0 software (SPSS Science SoftwareGmb, Erkrath, Germany). The comparison of two groups was assessed by the Mann-Whitney test, the level of significance is set at $p < 0.05$. In the case of a comparison of several matched groups, a Friedman's test was conducted. If a difference was observed among the groups ($p < 0.05$) then a test Wilcoxon followed by Bonferroni correction to compare each group two by two (significance level $p < 0.05/\text{number of comparison}$).

To investigate the existence of a correlation between two parameters, a normality test of Shapiro-Wilk (significance level $p < 0.05$) was performed on populations. If the population distribution was normal, the search for a correlation between the two parameters was evaluated by using the Pearson correlation test (significance level $p < 0.05$). In case of failure of the normality test, the test of Spearman rank correlation (significance level $p < 0.05$) was used.

For the analysis of population characteristics (gender, risk factors, etiology), the comparison of the two groups is achieved through a χ^2 test which was applied Yates correction.

2. Results

2.1. Clinical study

2.1.1. Characteristics of ischemic stroke patients

In this study, 40 patients have been recruited. Among these patients, 25 received rt-PA treatment within the first 4.5h after stroke onset. None of the different parameters presented in the table 1 was found statistically different between the 2 groups of patients.

2.1.2. Post-stroke serum BDNF levels and platelet count.

Measurements of serum BDNF levels were performed at the admission and at day 1, 7 and 90 and are shown in figure 2A. As compared to the levels measured at the admission, no significant differences were found in serum BDNF at the different considered time points and thus whatever the group of patients examined. However, when comparing the levels of serum BDNF between NFP and FP, our analysis revealed that patients receiving rt-PA

perfusion exhibited significant elevated BDNF levels at day 1 and day 7 ($p = 0.024$ and $p = 0.021$, respectively).

In order to verify whether the differences observed between NFP and FP groups were not due to change in thrombocytopenia, platelet count was assessed at the admission, day 1 and day 7 (Figure 2B). At the different time points considered, our results showed no difference in the number of platelets between NFP and FP groups (admission, $p = 0.796$; day 1, $p = 0.916$; day 7, $p = 1$).

2.1.3. Post-stroke t-PA activity and correlation between serum BDNF levels and serum t-PA activity

Serum t-PA (figure 3) activity was measured by fluorimetry at the admission (day 0) and at day 1, 7 and day 90. As compared to the activity measured at the admission, stroke has no significant effect and thus whatever the group of patients considered. As compared to NFP group, although t-PA activity was always more important in FP group, no statistical differences could be found between the 2 groups of patients at the different time points of the kinetic.

When analyzing the potential association between serum BDNF and t-PA activity (figure 4), our results showed that serum BDNF levels were significantly correlated to t-PA activity only at day 1 ($R_s = 0.582$, $p=0.002$), no other significant correlations being found at the other time points.

2.1.4. Impact of fibrinolysis on the variation of NIHSS score

As described previously, stroke severity evaluated by NIHSS score measurement was not found different between NFP and FP when compared at the different time of its evaluation (table 1). However, when assessing the variation of NIHSS score from admission to day 1, to day 7 and to day 90 (table 2A), our results evidenced a significant greater reduction of this score in FP group as compared to NFP group in the 3 different periods considered.

2.1.5. Correlation between serum BDNF and variation of NIHSS score

Since serum BDNF levels were found significantly higher in FP group as compared to NFP group at 2 different time points, potential correlations between serum BDNF levels

measured during the kinetic and NIHSS variation from admission (day 0) to day 1, to day 7 and to day 90 were verified. Results gathered in table 2B showed that serum BDNF levels measured all along this study were not correlated to the corresponding variations of NIHSS score.

2.1.6. Correlation between serum BDNF levels and cardiovascular score

The association between serum BDNF levels and cardiovascular score calculated as described in the method section, was evaluated in the figure 5. Our results showed that no correlation was found at day 1 and day 7 whereas a significant negative correlation was established between these 2 parameters at the admission and day 90 ($R_s = -0.450$, $p = 0.035$; $R_s = -0.508$, $p = 0.043$, respectively).

2.2. Preclinical study

2.2.1. Photothrombotic ischemia effects on post-stroke serum BDNF levels in rats receiving or not rt-PA perfusion

Serum BDNF levels was measured before and after (1h, 4h and 24h) the induction of photothrombotic ischemia (figure 6). As compared to the levels assessed before cerebral ischemia, our results showed that photothrombotic ischemia induced no significant variations in serum BDNF levels and thus whatever the time points considered. Regarding the impact of rt-PA perfusion, no statistical difference was found between rt-PA- and vehicle-treated animals at the different time points of the kinetic.

2.2.2. Photothrombotic ischemia effects on t-PA activity and correlation between serum BDNF and t-PA activity

t-PA activity was measured before and after (1h, 4h and 24h) the induction of photothrombotic ischemia. In vehicle-treated animals, no variation in t-PA activity was detected at the different ischemic time points in vehicle-treated animals (data not shown). However, regarding the effect of rt-PA perfusion, a major increase in t-PA activity was measured only at the end of rt-PA perfusion (1h) as compared to vehicle-treated animals (+513%, $p = 0.003$. Data not shown).

Concerning correlation between serum BDNF levels and t-PA activity (figure 7), no association was detected between these parameters at the different post-ischemic time points considered.

3. Discussion

Our study reveals that rt-PA administration was associated with increase in serum BDNF levels in patients at day 1 and day 7 after stroke onset. In addition, fibrinolysis was related to a greater reduction in NIHSS score confirming the beneficial effect of rt-PA treatment for stroke patients. Regarding potential correlations, serum BDNF levels was associated to serum t-PA activity at day 1 after admission but were not correlated to NIHSS score reduction. Besides, a negative correlation was identified between serum BDNF levels at the admission and day 90 and the cardiovascular score suggesting an involvement of cardiovascular health status in serum BDNF levels. Regarding our results obtained in animals, oppositely, no variation was measured in post-stroke serum BDNF levels between rt-PA-treated and vehicle-treated animals and no correlation was found between serum BDNF levels and t-PA activity.

In humans, the variation of post-stroke circulating BDNF levels is poorly documented. Plasma BDNF levels were found not modified in the acute phase of stroke (Di Lazzaro et al., 2007). Whereas, a decrease in serum BDNF levels has been evidenced in the context of post-stroke depression (PSD) in which circulating BDNF levels were found lower at the acute (day 1) or the chronic (3-6 months) stages of stroke in PSD patients (Yang et al., 2011, Zhou et al., 2011). In other neurological diseases, low serum BDNF levels have been proposed to be linked to hippocampus shrinkage and poorer memory in the context of aging (Erickson et al., 2010) and to be reduced in persons with Alzheimer disease (AD) or destined to develop dementia or AD (Weinstein et al., 2014).

The recombinant form of t-PA is the gold standard treatment of cerebral artery thrombosis. Depending on the stroke outcome scale, this treatment exhibits from 11% to 13% absolute benefit (Vivien et al., 2011) which may explain that no statistical difference was found concerning the NIHSS score at the different post-stroke time points in the modest population recruited in our study. However, although the score was not found different between the 2 groups of patients, its reduction was significantly more important in stroke

patients receiving rt-PA than in non-fibrinolyzed patients which is consistent with the beneficial effect evidenced by numerous clinical trials of thrombolytic therapy. The most striking finding of our study is the significant increase of serum BDNF levels observed at day 1 and day 7 in stroke patients treated with rt-PA as compared to non-fibrinolyzed patients. This increase that was not due to a difference in platelets count, together with the correlation between serum BDNF levels and t-PA activity at day 1 suggests a causative link between t-PA and BDNF metabolism in the acute phase of stroke. Although speculative, different mechanisms can be proposed to explain this relationship. The observed rise in circulating BDNF levels in fibrinolyzed patients could be due to the primary function of rt-PA which, achieving recanalization, is beneficial for the brain and its subsequent production of BDNF. This hypothesis is consistent with data showing that BDNF can be transported across the blood brain barrier (Pan et al., 1998) and with a study evidencing in humans, an important brain release of BDNF by measuring the arterial-to-internal jugular venous difference following physical exercise that is known to augment brain BDNF production (Rasmussen et al., 2009). Consistently, in animal studies, BDNF expression is increased in response to different models of cerebral ischemia (Kokaia et al., 1995, Madinier et al., 2013) and more strikingly, rt-PA has been shown to induce a rise in hippocampal mature BDNF expression through NMDA receptors potentiation in physiological conditions in rats (Rodier et al., 2014). Alternatively, since rt-PA has been shown to augment the permeability of the blood brain barrier through mechanisms related to its numerous interactions with the cellular components of the neurovascular unit (Vivien et al., 2011), brain BDNF release could be facilitated in rt-PA-treated patients.

Consequently, the observed rise in post-stroke serum BDNF levels as a reflect of brain production could explained the greater reduction in NIHSS score measured in rt-PA-treated patients. This hypothesis is in line with animals studies showing that strategies that upregulate brain BDNF production are frequently linked to an improvement in post-stroke functional recovery (Ploughman et al., 2009, Ke et al., 2011, Zhu et al., 2011, Ambrogini et al., 2013, Seo et al., 2014) and oppositely, that depleting or blocking BDNF action after stroke attenuates neuroplastic changes and functional recovery induced by rehabilitation (Endres et al., 2000). Thus, post-stroke serum BDNF could appear as an appealing biomarker of stroke outcome. However, when assessing the relationship between serum BDNF levels

and the reduction in NIHSS score from day 0 to day 1, to day 7 or to day 90, no associations could be found between these two parameters. Besides, when performing a parallel approach in a homogenous population of rats submitted to a reproducible photothrombotic cerebral ischemia model, no variation in post-stroke serum BDNF levels was detected between rt-PA-treated and vehicle-treated animals despite the fact that this model of cerebral ischemia has been shown to be fibrinolyzable by rt-PA (Umemura et al., 2008). Lastly, no correlation was found between serum BDNF levels and t-PA activity. This bench to bedside discrepancy questions the pertinence of the observed effect in stroke patients receiving rt-PA perfusion and highlights the existence of potential confounders among our patients population. In line with this idea, numerous determinants of circulating BDNF levels have been proposed such as gender, platelet counts, Val66Met polymorphism, smoking status, depression and age (Fujimura et al., 2002, Lommatzsch et al., 2005, Begliuomini et al., 2007, Trajkovska et al., 2007, Golden et al., 2010, Bus et al., 2011, Yang et al., 2011, Zhou et al., 2011) for which no differences were established or analyzed (Val66Met) between the 2 groups of patients. However, based to the fact that pathologies linked to endothelial dysfunction such as hypertension (Ghiadoni et al., 2012) or type 2 diabetes (Krabbe et al., 2007) have also been related to a decrease in blood BDNF levels, the European cardiovascular risk score was calculated and correlated to serum BDNF levels. Our results showed a negative association between this two parameters at the admission and day 90 evidencing that post-stroke blood BDNF levels could be a reflect of cardiovascular health status. Interestingly, endothelial cells from peripheral or central vessels have been shown to express BDNF (Nakahashi et al., 2000, Bejot et al., 2011c, Quirie et al., 2012). In addition, strategies such as physical exercise that is unanimously recognized to be beneficial to cardiovascular and brain health is known to induce endothelial BDNF expression while on the contrary, hypertension has been shown to alter BDNF metabolism in the endothelium (Prigent-Tessier et al., 2013). Thus, circulating BDNF levels could also be related to vascular BDNF expression and mirror endothelial dysfunction. This negative correlation is indeed in line with a recent study showing that low serum BDNF levels could be predictive of vascular brain injury and associated with increased risk of incident stroke or transient ischemia attack (Pikula et al., 2013).

In conclusion, it would have been tempting to consider post-stroke levels of serum BDNF as biomarker of rt-PA treatment efficacy. However, according to the absence of correlation between serum BDNF and neurological improvement and the discrepancy observed between results obtained in humans and animals, overall data suggest that serum BDNF may not have utility as a predictive biomarker of stroke outcome. Alternatively, our data identifying association between post-stroke serum BDNF levels and the cardiovascular health status rather suggest that circulating BDNF is potentially reflecting endothelial dysfunction.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the University of Burgundy, the Region of Burgundy and the INSERM, France. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

- Ambrogini P, Lattanzi D, Ciuffoli S, Betti M, Fanelli M, Cuppini R (2013) Physical exercise and environment exploration affect synaptogenesis in adult-generated neurons in the rat dentate gyrus: possible role of BDNF. *Brain research* 1534:1-12.
- Baranes D, Lederfein D, Huang YY, Chen M, Bailey CH, Kandel ER (1998) Tissue plasminogen activator contributes to the late phase of LTP and to synaptic growth in the hippocampal mossy fiber pathway. *Neuron* 21:813-825.
- Begliumini S, Casarosa E, Pluchino N, Lenzi E, Centofanti M, Freschi L, Pieri M, Genazzani AD, Luisi S, Genazzani AR (2007) Influence of endogenous and exogenous sex hormones on plasma brain-derived neurotrophic factor. *Hum Reprod* 22:995-1002.
- Bejot Y, Prigent-Tessier A, Cachia C, Giroud M, Mossiat C, Bertrand N, Garnier P, Marie C (2011) Time-dependent contribution of non neuronal cells to BDNF production after ischemic stroke in rats. *Neurochemistry international* 58:102-111.
- Benchenane K, Berezowski V, Ali C, Fernandez-Monreal M, Lopez-Atalaya JP, Brillault J, Chuquet J, Nouvelot A, MacKenzie ET, Bu G, Cecchelli R, Touzani O, Vivien D (2005) Tissue-type plasminogen activator crosses the intact blood-brain barrier by low-density lipoprotein receptor-related protein-mediated transcytosis. *Circulation* 111:2241-2249.
- Bus BA, Molendijk ML, Penninx BJ, Buitelaar JK, Kenis G, Prickaerts J, Elzinga BM, Voshaar RC (2011) Determinants of serum brain-derived neurotrophic factor. *Psychoneuroendocrinology* 36:228-239.
- Carmeliet P, Schoonjans L, Kieckens L, Ream B, Degen J, Bronson R, De Vos R, van den Oord JJ, Collen D, Mulligan RC (1994) Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice. *Nature* 368:419-424.
- Di Lazzaro V, Profice P, Pilato F, Dileone M, Florio L, Tonali PA, Angelucci F (2007) BDNF plasma levels in acute stroke. *Neuroscience letters* 422:128-130.
- Dwivedi Y (2013) Involvement of brain-derived neurotrophic factor in late-life depression. *The American journal of geriatric psychiatry : official journal of the American Association for Geriatric Psychiatry* 21:433-449.
- Endres M, Fan G, Hirt L, Fujii M, Matsushita K, Liu X, Jaenisch R, Moskowitz MA (2000) Ischemic brain damage in mice after selectively modifying BDNF or NT4 gene expression. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 20:139-144.
- Erickson KI, Prakash RS, Voss MW, Chaddock L, Heo S, McLaren M, Pence BD, Martin SA, Vieira VJ, Woods JA, McAuley E, Kramer AF (2010) Brain-derived neurotrophic factor is associated with age-related decline in hippocampal volume. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:5368-5375.
- Fujimura H, Altar CA, Chen R, Nakamura T, Nakahashi T, Kambayashi J, Sun B, Tandon NN (2002) Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation. *Thrombosis and haemostasis* 87:728-734.
- Ghiadoni L, Taddei S, Virdis A (2012) Hypertension and endothelial dysfunction: therapeutic approach. *Current vascular pharmacology* 10:42-60.
- Golden E, Emiliano A, Maudsley S, Windham BG, Carlson OD, Egan JM, Driscoll I, Ferrucci L, Martin B, Mattson MP (2010) Circulating brain-derived neurotrophic factor and indices of metabolic and cardiovascular health: data from the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *PLoS one* 5:e10099.
- Huang YY, Bach ME, Lipp HP, Zhuo M, Wolfer DP, Hawkins RD, Schoonjans L, Kandel ER, Godfraind JM, Mulligan R, Collen D, Carmeliet P (1996) Mice lacking the gene encoding tissue-type plasminogen activator show a selective interference with late-phase long-term potentiation in both Schaffer collateral and mossy fiber pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:8699-8704.
- Ke Z, Yip SP, Li L, Zheng XX, Tong KY (2011) The effects of voluntary, involuntary, and forced exercises on brain-derived neurotrophic factor and motor function recovery: a rat brain ischemia model. *PLoS one* 6:e16643.

- Kokaia Z, Zhao Q, Kokaia M, Elmer E, Metsis M, Smith ML, Siesjö BK, Lindvall O (1995) Regulation of brain-derived neurotrophic factor gene expression after transient middle cerebral artery occlusion with and without brain damage. *Experimental neurology* 136:73-88.
- Krabbe KS, Nielsen AR, Krogh-Madsen R, Plomgaard P, Rasmussen P, Erikstrup C, Fischer CP, Lindegaard B, Petersen AM, Taudorf S, Secher NH, Pilegaard H, Bruunsgaard H, Pedersen BK (2007) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and type 2 diabetes. *Diabetologia* 50:431-438.
- Lemarchant S, Docagne F, Emery E, Vivien D, Ali C, Rubio M (2012) tPA in the injured central nervous system: different scenarios starring the same actor? *Neuropharmacology* 62:749-756.
- Lommatzsch M, Zingler D, Schuhbaeck K, Schloetcke K, Zingler C, Schuff-Werner P, Virchow JC (2005) The impact of age, weight and gender on BDNF levels in human platelets and plasma. *Neurobiology of aging* 26:115-123.
- Madinier A, Bertrand N, Rodier M, Quirie A, Mossiat C, Prigent-Tessier A, Marie C, Garnier P (2013) Ipsilateral versus contralateral spontaneous post-stroke neuroplastic changes: involvement of BDNF? *Neuroscience* 231:169-181.
- Millerot-Serruot E, Chausset A, Mossiat C, Prigent-Tessier A, Bertrand N, Garnier P, Beley A, Marie C (2007) Effect of early decrease in the lesion size on late brain tissue loss, synaptophysin expression and functionality after a focal brain lesion in rats. *Neurochemistry international* 50:328-335.
- Munkholm K, Pedersen BK, Kessing LV, Vinberg M (2014) Elevated levels of plasma brain derived neurotrophic factor in rapid cycling bipolar disorder patients. *Psychoneuroendocrinology* 47:199-211.
- Nagappan G, Zaitsev E, Senatorov VV, Jr., Yang J, Hempstead BL, Lu B (2009) Control of extracellular cleavage of ProBDNF by high frequency neuronal activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:1267-1272.
- Nakhashi T, Fujimura H, Altar CA, Li J, Kambayashi J, Tandon NN, Sun B (2000) Vascular endothelial cells synthesize and secrete brain-derived neurotrophic factor. *FEBS letters* 470:113-117.
- Pan W, Banks WA, Fasold MB, Bluth J, Kastin AJ (1998) Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier. *Neuropharmacology* 37:1553-1561.
- Pang PT, Teng HK, Zaitsev E, Woo NT, Sakata K, Zhen S, Teng KK, Yung WH, Hempstead BL, Lu B (2004) Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science* 306:487-491.
- Pikula A, Beiser AS, Chen TC, Preis SR, Vorgias D, DeCarli C, Au R, Kelly-Hayes M, Kase CS, Wolf PA, Vasan RS, Seshadri S (2013) Serum brain-derived neurotrophic factor and vascular endothelial growth factor levels are associated with risk of stroke and vascular brain injury: Framingham Study. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 44:2768-2775.
- Ploughman M, Windle V, MacLellan CL, White N, Dore JJ, Corbett D (2009) Brain-derived neurotrophic factor contributes to recovery of skilled reaching after focal ischemia in rats. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 40:1490-1495.
- Prigent-Tessier A, Quirie A, Maguin-Gate K, Szostak J, Mossiat C, Nappey M, Devaux S, Marie C, Demougeot C (2013) Physical training and hypertension have opposite effects on endothelial brain-derived neurotrophic factor expression. *Cardiovascular research* 100:374-382.
- Quirie A, Hervieu M, Garnier P, Demougeot C, Mossiat C, Bertrand N, Martin A, Marie C, Prigent-Tessier A (2012) Comparative effect of treadmill exercise on mature BDNF production in control versus stroke rats. *PloS one* 7:e44218.
- Rasmussen P, Brassard P, Adser H, Pedersen MV, Leick L, Hart E, Secher NH, Pedersen BK, Pilegaard H (2009) Evidence for a release of brain-derived neurotrophic factor from the brain during exercise. *Experimental physiology* 94:1062-1069.
- Rodier M, Prigent-Tessier A, Bejot Y, Jacquin A, Mossiat C, Marie C, Garnier P (2014) Exogenous t-PA Administration Increases Hippocampal Mature BDNF Levels. Plasmin- or NMDA-Dependent Mechanism? *PloS one* 9:e92416.

- Rosenfeld RD, Zeni L, Haniu M, Talvenheimo J, Radka SF, Bennett L, Miller JA, Welcher AA (1995) Purification and identification of brain-derived neurotrophic factor from human serum. *Protein expression and purification* 6:465-471.
- Seo MK, Lee CH, Cho HY, Lee JG, Lee BJ, Kim JE, Seol W, Kim YH, Park SW (2014) Effects of antidepressant drugs on synaptic protein levels and dendritic outgrowth in hippocampal neuronal cultures. *Neuropharmacology* 79:222-233.
- Trajkovska V, Marcussen AB, Vinberg M, Hartvig P, Aznar S, Knudsen GM (2007) Measurements of brain-derived neurotrophic factor: methodological aspects and demographical data. *Brain research bulletin* 73:143-149.
- Umemura K, Higo K, Sakata T, Yuki S, Iwata K, Yamaguchi K (2008) Effects of alteplase, a thrombolytic agent, in a rat photothrombotic middle cerebral artery occlusion model. *Pathophysiology of haemostasis and thrombosis* 36:245-250.
- Vivien D, Gauberti M, Montagne A, Defer G, Touze E (2011) Impact of tissue plasminogen activator on the neurovascular unit: from clinical data to experimental evidence. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 31:2119-2134.
- Weinstein G, Beiser AS, Choi SH, Preis SR, Chen TC, Vorgas D, Au R, Pikula A, Wolf PA, DeStefano AL, Vasan RS, Seshadri S (2014) Serum brain-derived neurotrophic factor and the risk for dementia: the Framingham Heart Study. *JAMA neurology* 71:55-61.
- Yang L, Zhang Z, Sun D, Xu Z, Yuan Y, Zhang X, Li L (2011) Low serum BDNF may indicate the development of PSD in patients with acute ischemic stroke. *International journal of geriatric psychiatry* 26:495-502.
- Yepes M, Roussel BD, Ali C, Vivien D (2009) Tissue-type plasminogen activator in the ischemic brain: more than a thrombolytic. *Trends in neurosciences* 32:48-55.
- Zhou Z, Lu T, Xu G, Yue X, Zhu W, Ma M, Liu W, Zhu S, Liu X (2011) Decreased serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is associated with post-stroke depression but not with BDNF gene Val66Met polymorphism. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC* 49:185-189.
- Zhu JM, Zhao YY, Chen SD, Zhang WH, Lou L, Jin X (2011) Functional recovery after transplantation of neural stem cells modified by brain-derived neurotrophic factor in rats with cerebral ischaemia. *The Journal of international medical research* 39:488-498.

Table 1. Population characteristics in stroke patients (NFP = Non fibrinolyzed patient, n = 15 and FP = Fibrinolyzed patients, n = 25). Values are expressed as mean \pm SEM (Demographic characteristics, neuropsychological function) or numbers of patients (Lesion location, stroke etiology, vascular risk factors, death). BMI = Body mass index, NIHSS = National Institute of Health Stroke Scale, NS = non significant.

Variables	Non Fibrinolyzed Patients (NFP ; n=15)	Fibrinolyzed Patients (FP ; n=25)	p value
Demographic Characteristics			
Sex (M/F)	8/7	14/11	-
Age (years). mean \pm SEM	74.71 \pm 3.43	68.88 \pm 2.94	NS
BMI (kg/m ²). mean \pm SEM	26.11 \pm 0.84	25.00 \pm 5	
Lesion Location			
Left Hemisphere	9	16	NS
Right Hemisphere	5	9	NS
Both Hemispheres	1	0	-
Stroke Etiology			
Cardioembolic	5	10	NS
Atherosclerosis	4	7	NS
Lacunar infarction or Undetermined	6	8	NS
Vascular risk factors			
Hypertension	7	14	NS
Diabetes	1	5	NS
Hypercholesterolemia	1	9	NS
Smoking	3	6	NS
Alcoholism	3	4	NS
(Heart failure/ Atrial fibrillation/ Stroke history/ Myocardial infarction history)	5	7	NS
Neuropsychological functions			
NIHSS on admission (mean \pm SEM)	11.44 \pm 2.25	11.20 \pm 1.34	NS
NIHSS at D1 (mean \pm SEM)	11.67 \pm 3.13	8.17 \pm 1.75	NS
NIHSS at D7 (mean \pm SEM)	9.43 \pm 2.53	5.60 \pm 1.64	NS
NIHSS at D90 (mean \pm SEM)	3.86 \pm 1.51	2.00 \pm 0.97	NS
Death	2	5	NS

Table 2. (A) Comparison NIHSS score evolution between non fibrinolyzed (NFP, n = 15) and fibrinolyzed patients (FP, n = 25) over periods ranging from D0 to D1, D0 to D7 and D0 to D90. Values are expressed as mean \pm SEM. NIHSS = National Institute of Health Stroke Scale. **(B)** Correlation between NIHSS score variations over periods ranging from D0 to D1, D0 to D7 and D0 to D90 and serum BDNF levels in stroke patients (NFP + FP) at D0, D1, D7 and D90. Significance level $p < 0.05$. NIHSS = National Institute of Health Stroke Scale.

A		NFP (mean \pm SEM)	FP (mean \pm SEM)	p value
	NIHSS variations between D0-D1	0.222 \pm 1.560	-3.500 \pm 0.793	0.032 *
	NIHSS variations between D0-D7	-1.857 \pm 0.799	-5.625 \pm 0.889	0.01 *
	NIHSS variations between D0-D90	-4.833 \pm 1.205	-10.333 \pm 1.133	0.014 *

B	Correlation	Serum BDNF levels			
		D0	D1	D7	D90
	NIHSS variations between D0-D1	Rs = -0,105 p = 0,705 n = 15	-	-	-
	NIHSS variations between D0-D7	Rs = -0,406 p = 0,181 n = 12	Rs = 0,0212 p = 0,939 n = 12	-	-
	NIHSS variations between D0-D90	Rs = -0,444 p = 0,159 n = 11	Rs = -0,0915 p = 0,776 n = 11	Rs = -0,312 p = 0,381 n = 9	-

Figure 1. Serum BDNF levels in stroke patients with a systolic blood pressure lower or higher than 160 mmHg at the admission. Measurements were realized at D0, D1, D7 and D90 after ischemic stroke. Values are expressed as means \pm SEM. Significance level $p < 0.05$.

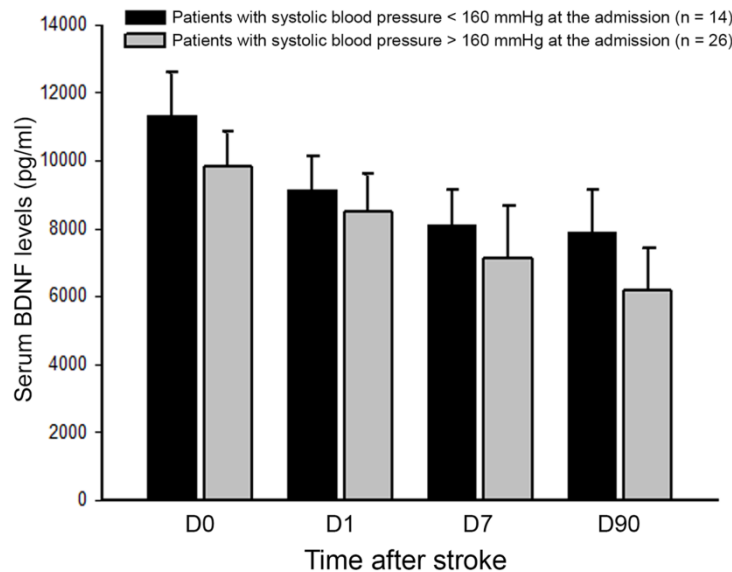


Figure 2. (A) Serum BDNF levels in stroke patients (NFP, n = 15 and FP, n = 25) assessed at D0, D1, D7 and D90 after ischemic stroke. Values are expressed as mean \pm SEM. Significance level (*) $p < 0.05$. **(B)** Platelets number in the blood of stroke patients (NFP, n = 15 and FP, n = 25). Platelets count was carried out at D0, D1 and D7 after ischemic stroke. Values are expressed as mean \pm SEM. Significance level $p < 0.05$.

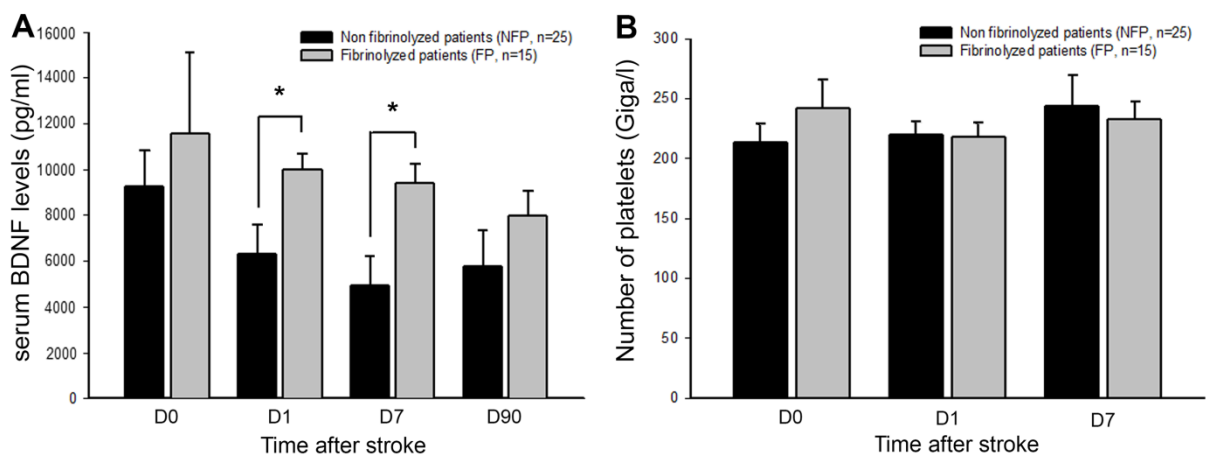


Figure 3. t-PA activity in serum of stroke patients (NFP, n = 15 and FP, n = 25). Measurements were realized at D0, D1, D7 and D90 after ischemic stroke. Values are expressed as mean \pm SEM. Significance level $p < 0.05$.

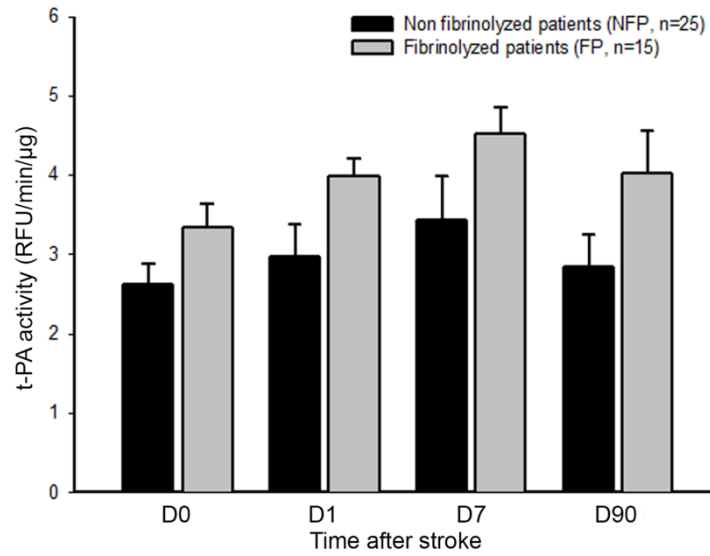


Figure 4. Correlation between serum BDNF and t-PA activity in stroke patients. BDNF levels and t-PA activity of all patients (NFP+FP) were assessed and correlated at D0, D1, D7 and D90 after ischemic stroke. Significance level (*) $p < 0.05$.

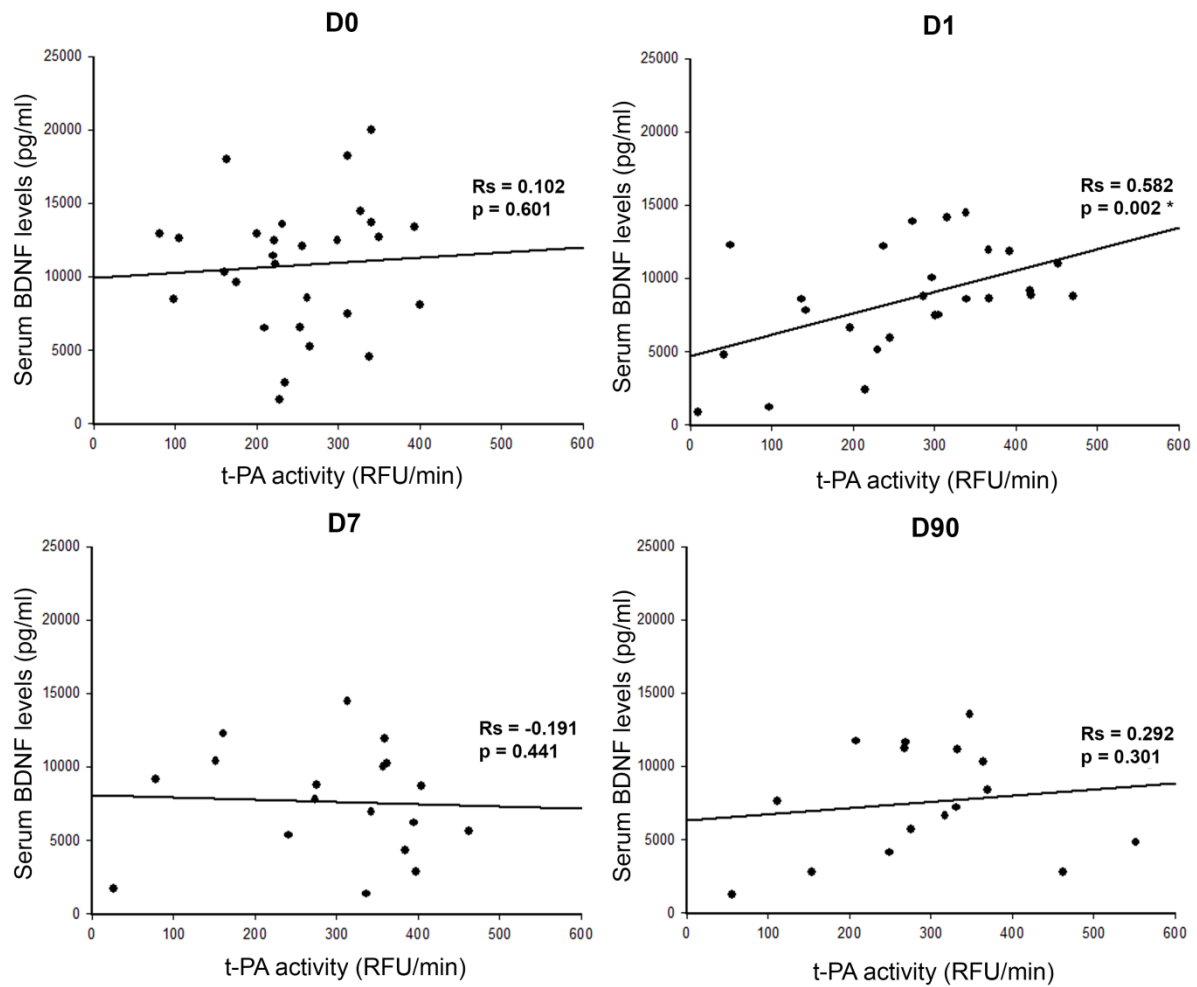


Figure 5. Correlation between serum BDNF and cardiovascular score in stroke patients. BDNF levels was assessed at D0, D1, D7 and D90 after ischemic stroke and correlated with cardiovascular score for all patients (NFP+FP). Significance level (*) $p < 0.05$.

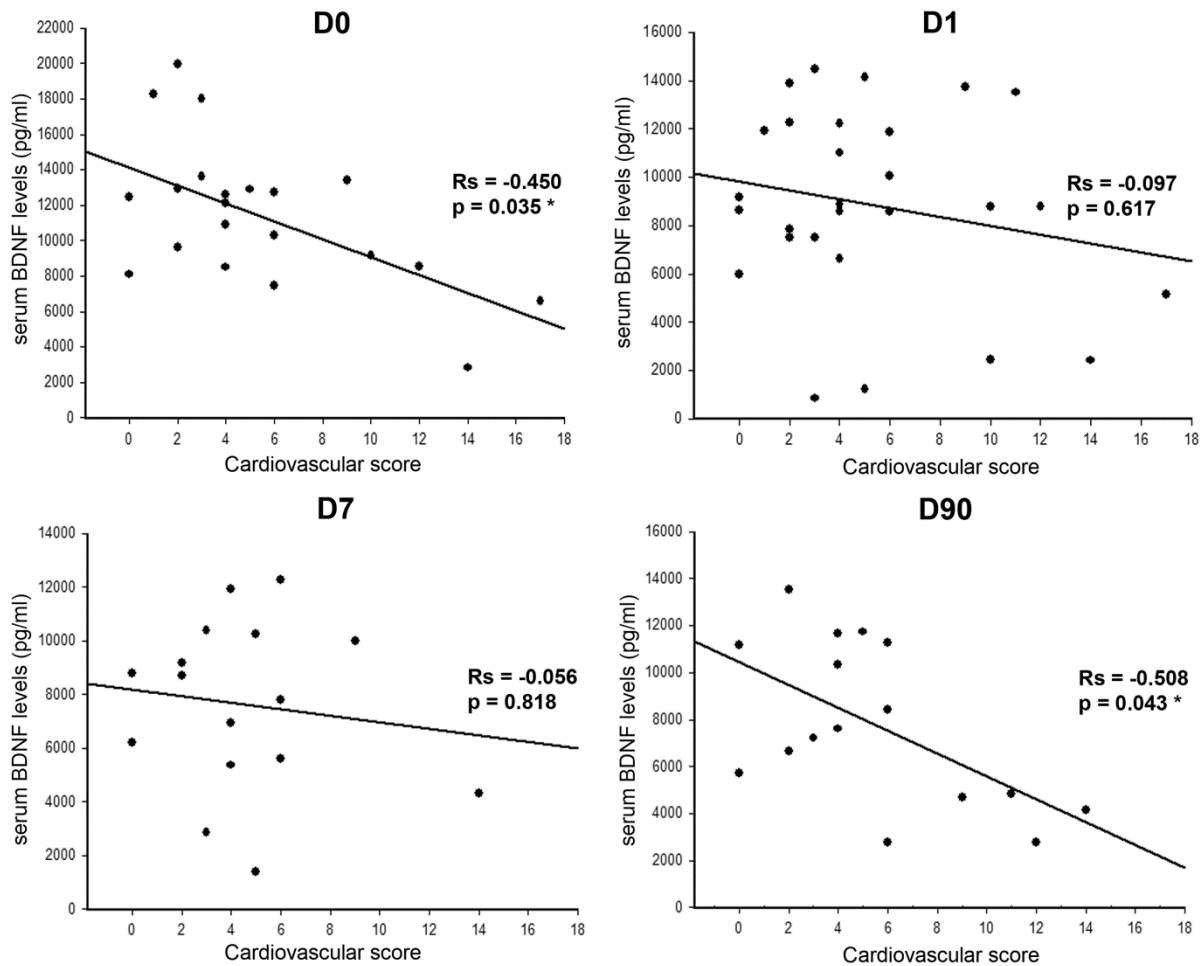


Figure 6. Serum BDNF levels in rats subjected to photothrombotic ischemia, treated or not with rt-PA. BDNF levels were assessed before ischemia, and after 1h, 4h and 24 h of ischemia. Values are expressed as mean \pm SEM. Significance level $p < 0.05$.

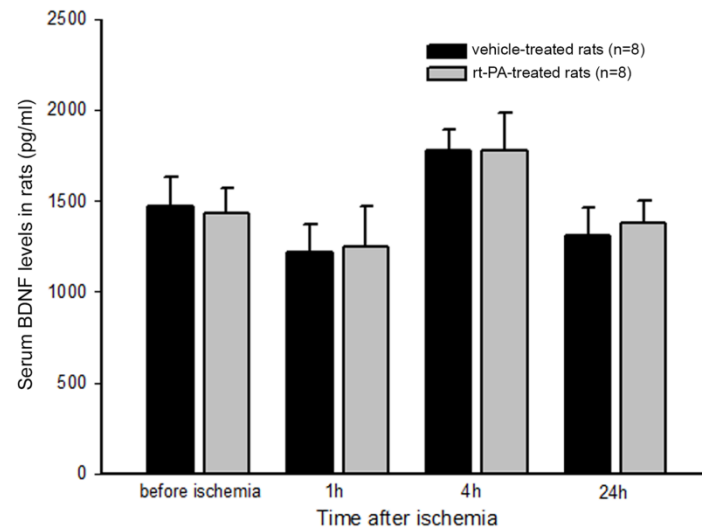
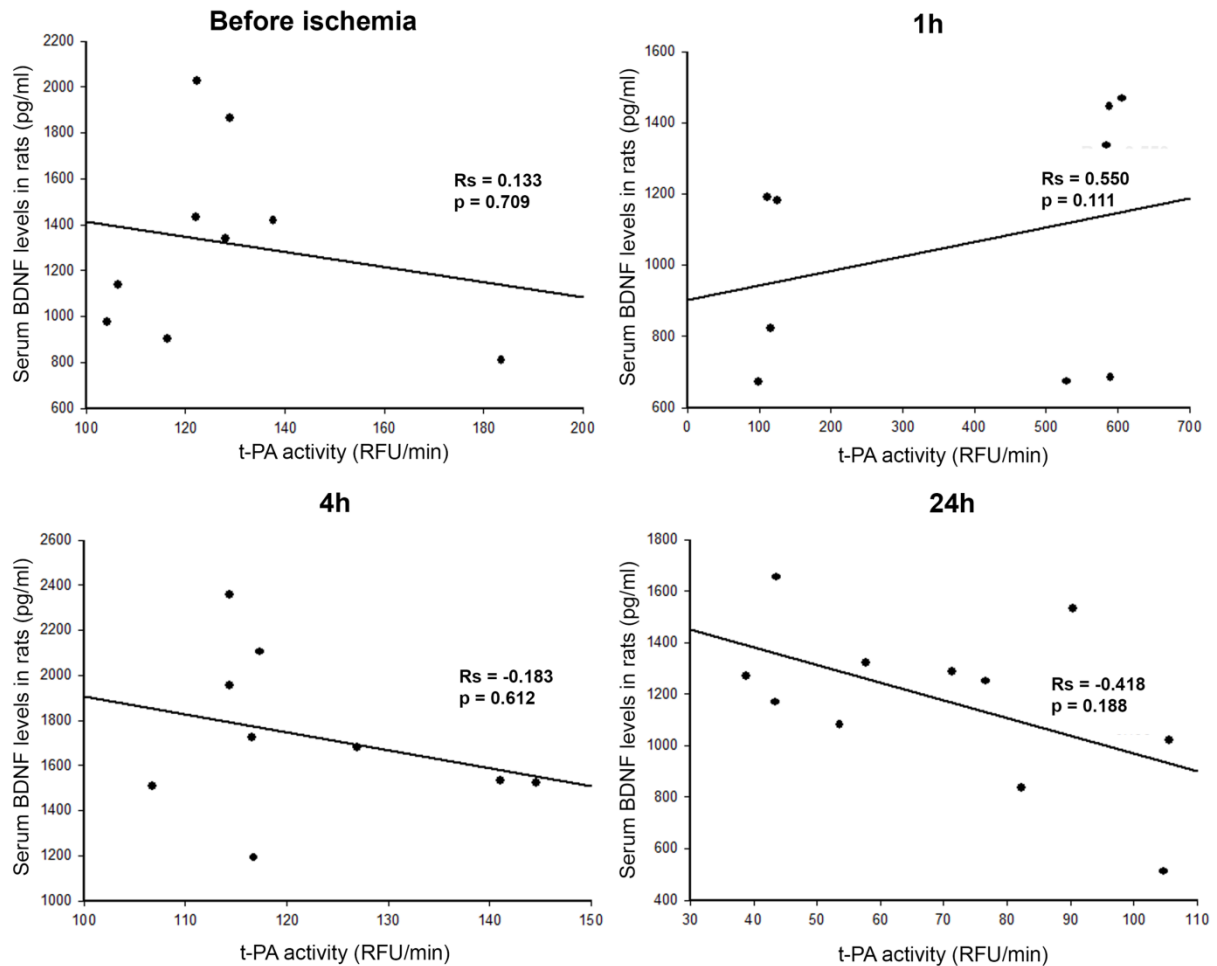
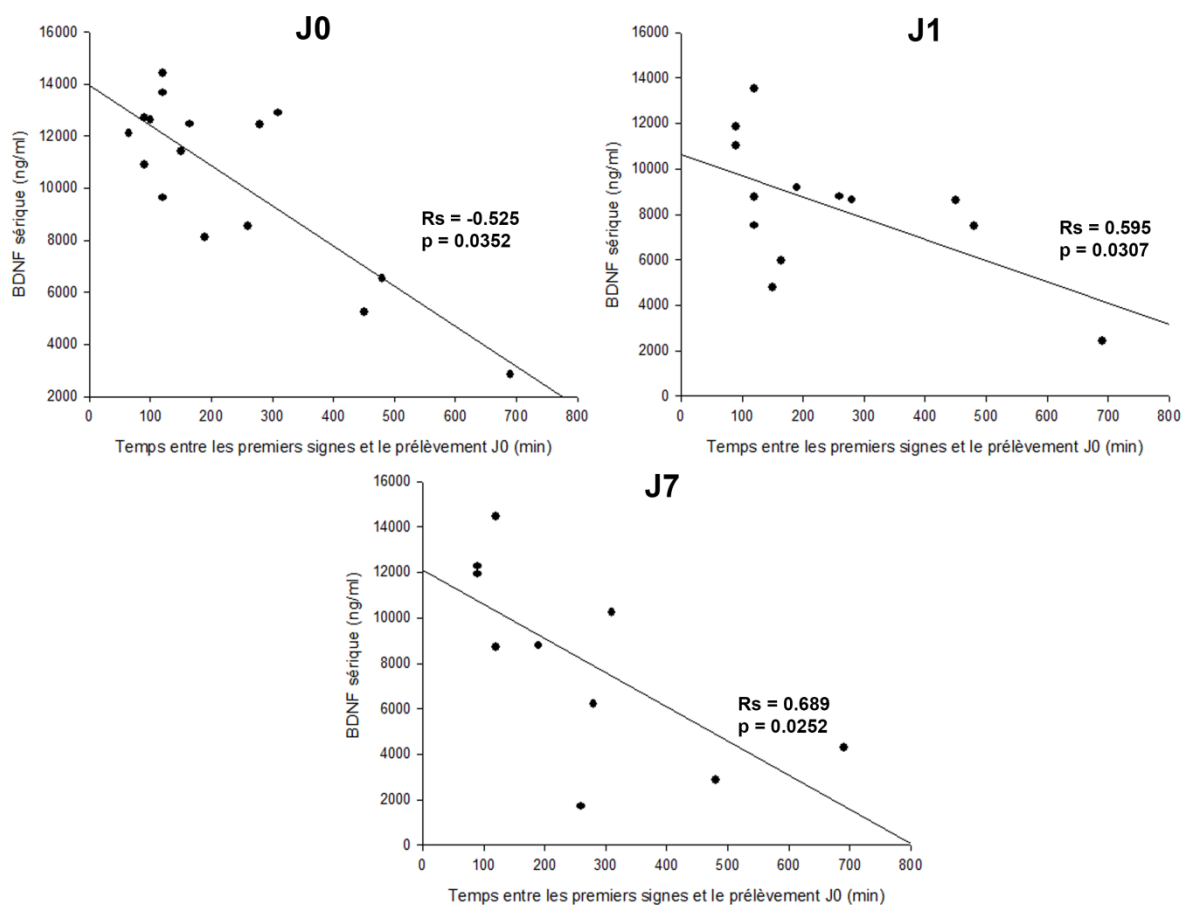


Figure 7. Correlation between BDNF levels and t-PA activity in serum of rats with cerebral ischemia treated or not treated with rt-PA. BDNF levels and t-PA activity were assessed and correlated before and after (1h, 4h and 24h) ischemia. Significance level $p < 0.05$.



D. Résultats complémentaires

Le délai moyen de prise en charge des patients, c'est-à-dire le temps écoulé entre le début des signes cliniques de l'AVC et le premier prélèvement de sang, est significativement plus long dans le groupe non fibrinolytés que fibrinolytés ($356,25 \pm 69,79$ vs $143,67 \pm 17,09$ min, $p = 0,008$). De ce fait, nous avons recherché l'existence d'une association entre le délai de prise en charge du patient et les taux de BDNF à J0, J1, J7 et J90. Une corrélation négative a été observée entre ce délai et les taux de BDNF aux temps J0, J1, et J7 (Figure 15), mais pas à J90 ($R_s = -0,269$; $p = 0,400$; résultats non présentés).



PARTIE 4 : DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Se basant sur l'idée que le t-PA traverse la BHE (Benchenane et al., 2005), l'objectif de ce travail de thèse a été de déterminer si l'effet bénéfique du traitement par rt-PA sur la récupération neurologique post-AVC pouvait être dépendant d'une augmentation des taux de BDNF dans le cerveau et pas uniquement de la réussite de la fibrinolyse. Ce travail s'est donc articulé autour de deux études. La première a été réalisée exclusivement chez l'animal et a étudié dans quelle mesure le rt-PA pouvait augmenter les taux de BDNFm dans le cerveau en conditions physiologiques. La deuxième a porté sur l'impact du rt-PA sur les taux circulants de BDNF en cas d'ischémie cérébrale chez l'Homme et chez l'animal, en admettant que ces taux soient un reflet des taux de cérébraux.

I. Etude 1

Le BDNFm a été mesuré dans l'hippocampe, le cortex et le striatum chez des rats traités par le rt-PA ou par le véhicule. Nous avons cherché à mimer le protocole clinique d'injection du rt-PA (bolus d'une minute suivi d'une perfusion d'une heure) et avons utilisé la dose de 10 mg/kg communément utilisée dans les études réalisées chez le rongeur en conditions ischémiques.

Les résultats montrent que la perfusion de rt-PA augmente significativement l'expression cérébrale de BDNFm 2h et 24h après le début de la perfusion. Cet effet du rt-PA s'observe dans l'hippocampe mais pas dans le cortex ni le striatum. Ce phénomène pourrait s'expliquer par des taux plus faibles d'inhibiteurs endogènes du (r)t-PA dans l'hippocampe (Vivien and Buisson, 2000). En effet, la perfusion de rt-PA augmente significativement l'activité t-PA exclusivement dans cette structure. Aussi, après son passage à travers la BHE, le rt-PA serait rapidement inhibé dans le cortex et le striatum, bloquant ainsi son effet sur le métabolisme du BDNF dans ces régions.

L'augmentation de l'expression de BDNFm dans l'hippocampe est associée à un accroissement du ratio p-TrkB/FL-TrkB, c'est-à-dire une activation accrue des récepteurs membranaires TrkB par le BDNFm, attestant que le BDNFm produit en réponse à la perfusion de rt-PA est biologiquement actif. Ce point est important car la mesure de l'expression du BDNFm dans un homogénat cérébral ne permet pas de prédire sa localisation (intra- ou extracellulaire).

Dans ce contexte, nous avons donc cherché à connaître les mécanismes mis en jeu dans l'augmentation par le rt-PA de l'expression du BDNFm. Notre première hypothèse a été que cette augmentation était le fruit d'un accroissement du clivage du proBDNF en BDNFm par la plasmine (Pang et al., 2004, Nagappan et al., 2009). Pour tester ce postulat, nous avons injecté en association avec le rt-PA un inhibiteur de la plasmine, l'acide tranexamique (TXA), à deux doses : 30 mg/kg et 300 mg/kg. Les résultats montrent que le TXA n'annule pas l'effet du rt-PA sur les taux de BDNFm, suggérant soit que le rt-PA n'augmente pas l'activité plasmine et donc la maturation extracellulaire du BDNF, soit que le TXA n'atteint pas le tissu cérébral en concentration suffisante. Cependant, même s'il est envisageable que le TXA ne passe pas la BHE, celui-ci est connu pour être à l'origine de convulsions (Furtmuller et al., 2002), ce qui laisse à penser que cette molécule est capable d'atteindre le parenchyme cérébral. Toutefois, afin d'éliminer cette hypothèse, nous avons mesuré l'activité plasmine dans l'hippocampe chez des animaux traités par TXA 300 mg/kg \pm rt-PA 10 mg/kg, et aucune variation d'activité n'a été observée que ce soit après injection de rt-PA ou de TXA seuls. De plus, l'activité plasmine basale détectée dans l'hippocampe des animaux traités par le véhicule est très faible et est à la limite de détection du kit. Cette faible activité peut s'expliquer par la forte expression dans cette structure d'un inhibiteur de la plasmine : l' α 2-antiplasmine (Kawashita et al., 2013), mais également par le fait que lors de l'homogénéisation de la structure cérébrale, les milieux intra- et extracellulaires sont mélangés. Le milieu extracellulaire ne représentant qu'environ 20 % du volume de la structure, une variation de l'activité plasmine, à moins d'être très importante, sera difficilement décelable et expliquerait l'absence d'augmentation de l'activité plasmine après injection de rt-PA seul. Pour ces mêmes raisons, une augmentation des taux de BDNFm suite à un clivage extracellulaire du proBDNF par la plasmine ne pourra être détectée dans nos conditions expérimentales que si elle est considérable.

La voie de la plasmine ne pouvant expliquer l'augmentation de BDNFm, nous avons reporté notre attention sur la mise en jeu potentielle de l'interaction t-PA/NMDA en utilisant un antagoniste non sélectif des NMDAR, le MK801, aux doses de 0,3 et 3 mg/kg. Les animaux traités par rt-PA + MK801 (quelle que soit la dose) ne présentent pas d'augmentation ni de l'expression de BDNFm ni du ratio p-TrkB/FL-TrkB par rapport aux animaux traités par le véhicule. L'augmentation de BDNFm induite par le rt-PA semble donc être la conséquence d'une activation des NMDAR. Ainsi, le rt-PA potentialise la neurotransmission

glutamatergique augmentant ainsi l'activité neuronale et par voie de conséquence la synthèse et la sécrétion régulée du BDNFm par les neurones (Greenberg et al., 2009). De plus, le rt-PA seul ou en association avec le MK801 n'a aucun effet sur l'expression de proBDNF dans l'hippocampe, à 2h comme à 24h. Si l'augmentation de BDNFm n'est pas associée à une diminution de proBDNF cela suggère que sa synthèse a été stimulée et qu'elle compense l'augmentation de son processing intracellulaire par la furine et/ou PC 1/7 (Mowla et al., 2001). L'analyse des taux d'ARNm codant le BDNF aurait toutefois été nécessaire afin de valider cette hypothèse. Par ailleurs, l'activation des récepteurs TrkB pré- et post-synaptiques par le BDNFm est connue pour induire l'expression du gène codant le t-PA (Bramham and Messaoudi, 2005), et favoriser sa sécrétion par les neurones (Fiumelli et al., 1999). De ce fait, le t-PA augmenterait la synthèse et la sécrétion de BDNF qui lui-même serait susceptible d'augmenter la sécrétion de t-PA. Cette boucle d'amplification tendrait à justifier le fait que l'activité t-PA ainsi que les taux de BDNFm retrouvés dans l'hippocampe sont plus élevés chez les animaux traités par le rt-PA que chez les animaux traités par le véhicule même 24h après le début de la perfusion.

Cette première étude offre différentes perspectives.

Premièrement, le MK801 étant un antagoniste non sélectif des sous-unités des NMDAR, il ne nous permet donc pas de discriminer la ou les sous-unités impliquées dans l'augmentation de BDNFm induite par le rt-PA. En effet, les sous-unités GluN1, GluN2B et GluN2D des NMDAR pourraient être mises en jeu. Leur identification nécessiterait des études plus approfondies et pourrait représenter un prolongement de ce travail.

L'implication de la sous-unité GluN1 pourrait être testée grâce à une technique d'auto-immunisation aboutissant à la production endogène par l'animal d'un anticorps dirigé contre la partie amino-terminal de la sous-unité qui aura pour objectif de bloquer son interaction avec le rt-PA (Fernandez-Monreal et al., 2004a, Macrez et al., 2011). Certaines études ayant suggéré que le récepteur LRP jouerait le rôle de co-récepteur dans l'activation des NMDAR *via* l'interaction rt-PA/GluN1 (Samson et al., 2008), l'utilisation de la protéine RAP pourrait également être envisagée. L'implication des sous-unités GluN2B et GluN2D pourrait, elle aussi, être testée grâce à des techniques d'auto-immunisation (Obiang et al., 2012) ou grâce à l'utilisation d'antagonistes spécifiques de ces sous-unités (Pawlak et al., 2005, Baron et al., 2010, Jullienne et al., 2011).

Néanmoins, il existe une prédominance d'expression des GluN2B dans l'hippocampe (Paoletti et al., 2013), seule région où l'on peut observer un impact de la perfusion de rt-PA sur les taux de BDNFm. Ces données suggèrent que le rt-PA induirait une augmentation de l'expression de BDNFm *via* une interaction avec la sous-unité GluN2B ou les sous-unités GluN1/GluN2B. Cette assertion est soutenue par nos résultats montrant que l'action du rt-PA sur le métabolisme de BDNFm est dépendante de la région étudiée et est en accord avec l'étude de Parcq *et al.* (2012) indiquant que l'interaction rt-PA/NMDAR serait excitotoxique dans le cortex et dans le striatum, mais pro-neuroplastique dans l'hippocampe.

Deuxièmement, il serait intéressant d'estimer l'impact fonctionnel de l'augmentation de BDNFm hippocampique après perfusion de rt-PA. Des tests de reconnaissance d'objet, de la piscine de Morris ou encore du labyrinthe en Y (Y-maze), pourraient être réalisés afin d'évaluer les capacités cognitives des rats traités par rt-PA. Un des points à définir concerne le rythme d'administration du rt-PA. Une seule injection est-elle suffisante ? Un traitement chronique est-il compatible avec un risque hémorragique acceptable ? En tous cas, un effet positif du rt-PA sur les fonctions cognitives pourraient pointer la stimulation de la neurotransmission glutamatergique comme une cible intéressante du traitement médicamenteux de maladies neurologiques ou psychiatriques associées à une diminution des taux cérébraux de BDNF, comme la maladie de Huntington ou encore la dépression (Autry and Monteggia, 2012, Lu et al., 2014). Néanmoins, le développement de molécules capables d'activer les NMDAR dans le but de déclencher la synthèse et la sécrétion de BDNFm, semble pour le moins compliqué. Ces molécules posséderont probablement une marge thérapeutique étroite en raison du caractère potentiellement excitotoxique du glutamate.

II. Etude 2

Sachant que les neurologues et les psychiatres considèrent les taux circulants de BDNF comme un reflet des taux cérébraux, et au vu des résultats de notre première étude, nous nous sommes intéressés cette fois-ci à l'impact du rt-PA sur les taux circulants de BDNF en cas d'ischémie.

Notre étude a inclus des patients victimes d'un AVC ayant bénéficié ou non de la fibrinolyse par le rt-PA. Pour chaque patient les taux sériques de BDNF, l'activité t-PA sérique et le score NIHSS ont été déterminés à l'admission hospitalière (J0), le lendemain (J1) puis 7 jours (J7) et 3 mois (J90) après la survenue de l'AVC. En parallèle, des rats Wistar mâles adultes ont été soumis à une ischémie cérébrale par photothrombose et ont été traités ou non par rt-PA à la dose de 10 mg/kg. Comme pour les patients, les animaux ont subi 4 prélèvements sanguins, avant et après (1h, 4h et 24h) l'induction de l'ischémie, en vue du dosage de BDNF et de la mesure de l'activité t-PA dans le sérum. Les principaux résultats montrent que 1) les taux circulants de BDNF et la récupération fonctionnelle sont supérieurs chez les patients fibrinolisés que non fibrinolisés, 2) il n'existe aucune association entre les taux circulants de BDNF et l'activité t-PA du sang sauf à J1, 3) il n'existe aucune association entre les taux circulants de BDNF et la récupération fonctionnelle post-AVC des patients, 4) les taux de BDNF circulants sont inversement corrélés au score cardiovasculaire des patients à J0 et J90 et au délai de prise en charge à J0, J1 et J7 et 5) aucune variation de BDNF circulant et aucune corrélation entre ces taux et l'activité t-PA n'ont été observées chez le Rat.

Notre étude montre pour la première fois que les taux circulants de BDNF sont plus élevés chez les patients fibrinolisés que non fibrinolisés de J1 (+ 60 %) à J7 (+ 90 %) alors qu'ils ne diffèrent pas statistiquement avant l'initiation de la fibrinolyse (J0) et à J90. Bien que le nombre de patients inclus dans notre étude soit relativement faible, il reste suffisant pour montrer que le traitement par le rt-PA améliore le pronostic clinique de l'AVC. En effet, l'amélioration neurologique observée dans les intervalles J0-J1, J1-J7 et J0-J90 est statistiquement plus importante au sein du groupe fibrinolysé qu'au sein du groupe non fibrinolysé. Ces données sont donc en accord avec les résultats des études cliniques à l'origine de la commercialisation de l'Alteplase (Hacke et al., 1998, Hacke et al., 2008). L'ensemble de ces résultats oriente vers la possibilité que le BDNF circulant en phase aigüe pourrait permettre de prédire le pronostic à 3 mois de l'AVC. Néanmoins, lorsque l'on prend en compte les taux de BDNF (à J0, J1 et J7) de l'ensemble des patients, c'est-à-dire traités et non traités par le rt-PA, aucune corrélation n'est observée entre ces taux et l'amélioration neurologique dans les intervalles J0-J1, J0-J7 et J0-J90. Ce résultat semble indiquer qu'en cas d'AVC, le BDNF circulant n'est pas un marqueur de santé cérébrale comme c'est le cas dans

la dépression (Autry and Monteggia, 2012), et qu'il ne semble pas être un marqueur pronostic fiable de l'amélioration neurologique post-AVC.

Le fait que les taux de BDNF soient plus élevés chez les patients fibrinolyés pourrait suggérer l'existence d'un lien entre t-PA et BDNF circulant. Ce lien est bien connu pour le BDNF cérébral. En effet, le t-PA *via* une augmentation de l'activité plasmin est l'une des enzymes qui assurent la dégradation extracellulaire du proBDNF en BDNFm (Pang et al., 2004, Nagappan et al., 2009). Nos résultats rapportent une corrélation positive entre l'activité sérique du t-PA et les taux de BDNF à J1, tous patients confondus. Peut-on en déduire une relation de cause à effet ? Si oui, il faut admettre que le proBDNF est présent dans le sang, ce qui reste à prouver, et que les anticorps anti-BDNF utilisés dans notre kit ELISA dosent le BDNF mature mais pas le proBDNF. Il est également envisageable que l'augmentation des taux circulants de BDNF soit la conséquence d'une augmentation de ses taux cérébraux induite par le rt-PA (Rodier et al., 2014). Cela signifierait que le BDNF est capable de traverser la BHE, or les études qui se sont intéressées au sujet sont peu nombreuses et leurs conclusions sont contradictoires (Pardridge et al., 1994, Pan et al., 1998). De plus, alors qu'il est désormais établi que la phase aiguë de l'ischémie s'accompagne chez l'animal d'une augmentation des taux cérébraux de BDNF (Madinier et al., 2013), l'absence de variations des taux circulants de BDNF chez nos rats n'est pas en faveur de l'hypothèse selon laquelle les taux circulants sont un reflet des taux cérébraux de BDNF. Enfin, il faudrait également admettre que le rt-PA est capable d'augmenter l'expression du BDNFm dans le cerveau en conditions ischémiques comme en conditions physiologiques. Des études complémentaires seront nécessaires pour répondre à cette question. Sans omettre le caractère excitotoxique du rt-PA, il serait intéressant d'étudier l'impact du rt-PA sur les taux de BDNFm aussi bien au niveau de la lésion, où il pourrait avoir un effet neuroprotecteur, que dans les régions épargnées par la lésion, où il pourrait exercer un effet neuroplastique.

Devant les résultats obtenus chez nos patients et chez nos animaux, nous avons cherché d'autres facteurs pouvant expliquer les variations des taux circulants de BDNF observés entre les patients fibrinolyés et non fibrinolyés. Ainsi, nous avons mis en évidence l'existence d'une corrélation négative entre le score cardiovasculaire du patient et

le taux de BDNF à l'admission. Considérant le score cardiovasculaire comme un index de la santé cardiovasculaire et plus précisément de la fonction endothéliale, ces données renforcent l'idée émergente selon laquelle le BDNF circulant pourrait être un reflet de la santé endothéliale. Cette idée se base sur 1) l'existence d'une forte expression du BDNF dans l'endothélium des vaisseaux qu'ils soient périphériques ou cérébraux (Quirie et al., 2012, Prigent-Tessier et al., 2013), 2) la capacité des cellules endothéliales aussi bien périphériques que cérébrales à sécréter le BDNF et ce, de manière dépendante de la fonction endothéliale (Nakhashi et al., 2000, Prigent-Tessier et al., 2013), 3) le nombre croissant d'études rapportant un taux circulant de BDNF plus faible chez les patients souffrant de maladies associées à une dysfonction endothéliale, comme le diabète ou l'HTA (Chaldakov et al., 2004, Manni et al., 2005, Krabbe et al., 2007, Lorgis et al., 2010), 4) la démonstration que des taux sériques bas de BDNF sont associés à une augmentation du risque d'être victime d'un AVC ou d'un AIT (Pikula et al., 2013). Enfin, l'absence de variation des taux sériques de BDNF chez nos rats, qui sont des animaux jeunes et dépourvus de pathologies liées à une dysfonction endothéliale, renforce l'idée que la santé cardiovasculaire est un facteur confondant des taux circulants de BDNF.

Le facteur principal d'éligibilité des patients à la fibrinolyse étant leur admission dans les 4h30 suivant les premiers symptômes, nous avons cherché à savoir si les taux plus élevés de BDNF chez les patients fibrinolisés ne pouvaient pas également s'expliquer par leur prise en charge plus rapide (2h pour le groupe fibrinolyté vs 6h pour le groupe non fibrinolyté dans notre étude). Les résultats rapportent une corrélation entre le délai de prise en charge (temps écoulé entre premiers signes cliniques et prélèvement sanguin à J0) et les taux de BDNF non seulement à J0 mais aussi à J1 et J7. Cette donnée montre que les taux de BDNF dans la phase aigüe de l'AVC dépendent du délai de la prise en charge hospitalière. Ce point est important pour les études cliniques futures sur le BDNF qui devront inclure ce délai comme un facteur confondant dans l'analyse des résultats.

Une des limites de notre étude est le nombre de données manquantes aux différents temps pour plusieurs patients (départs dans des centres hospitaliers éloignés géographiquement, non réalisation des suivis à 3 mois...). Cette perte diminue la pertinence de nos résultats sur la cinétique des taux de BDNF et de l'activité t-PA, et ne nous a pas

permis d'analyser certaines données comme le déficit cognitif, testé par MMSE (Mini-Mental State Examination) et MoCA (Montreal Cognitive Assessment), la fatigue, testée par FSS (Fatigue Severity Scale), et la dépression, testée par MADRS (Montgomery and Asberg Depression Rating Scale). Une autre limite est d'avoir calculé le score cardiovasculaire avec les valeurs de pression artérielle systolique (PAS) à l'admission. Le score cardiovasculaire est donc surestimé car l'ischémie s'accompagne fréquemment d'une élévation de la PAS. Cependant, l'absence de corrélation entre la PAS et le taux sérique de BDNF à l'admission atténue le biais.

En résumé, notre étude met en évidence que le rt-PA présente un impact sur les taux circulants de BDNF et la récupération neurologique post-AVC qui peut être considérée comme un marqueur de neuroplasticité et donc de production cérébrale de BDNF. Cependant, l'absence de corrélation entre ces deux paramètres n'est pas en faveur de l'utilisation du BDNF circulant comme un marqueur prédictif de la récupération post-AVC et semble remettre en question, en cas d'AVC, l'hypothèse selon laquelle le BDNF circulant est un reflet du BDNF cérébral. Néanmoins, notre étude soutient l'existence d'un lien entre taux circulants de BDNF et santé cardiovasculaire et offrent différentes perspectives d'études.

Une première étude pourrait être réalisée avec pour objectif de rechercher les corrélations existantes au cours de l'AVC entre les taux circulants de BDNF et les taux circulants de marqueurs de fonction endothéliale utilisés en recherche clinique, tels que :

- les nitrites et nitrates qui sont un reflet de la production de NO par l'endothélium (Beishuizen et al., 2005),
- l'ADMA, un inhibiteur endogène de eNOS (Bouras et al., 2013),
- les ICAM et VCAM, qui sont des facteurs d'adhésion activés au cours du processus inflammatoire (Horstman et al., 2004).

Une deuxième étude pourrait également être menée, s'intéressant cette fois au lien existant entre l'expression du BDNF par la cellule endothéliale et ses taux circulants au cours de pathologies associées à une dysfonction endothéliale comme l'HTA, le diabète, l'obésité ou encore l'arthrite. En effet, le laboratoire a récemment montré que l'HTA diminue l'expression du BDNF par la cellule endothéliale (Prigent-Tessier et al., 2013), l'étape

suivante consisterait donc à savoir si le BDNF retrouvé dans le sang a pour origine la cellule endothéliale.

L'ensemble de nos deux études est en faveur de l'idée selon laquelle le rt-PA pourrait être bénéfique dans l'AVC *via* une augmentation des taux de BDNF dans le cerveau. Néanmoins, ces données suggérant un rôle potentiellement pro-neuroplastique du rt-PA ne doivent pas occulter la propension de cette molécule à potentialiser les phénomènes excitotoxiques induits par l'ischémie. De ce fait, le développement de molécules fibrinolytiques modifiées, dont l'action serait limitée à la dégradation du caillot sanguin et au compartiment vasculaire, semble être un prérequis pour le traitement d'un plus grand nombre de patients dans une fenêtre thérapeutique étendue.

Même si nos travaux restent en faveur du fait que les taux circulants de BDNF sont un reflet de l'effet bénéfique du rt-PA, nos résultats suggèrent que son dosage sanguin ne permet pas à lui seul de prédire l'évolution neurologique du patient, et mettent en évidence les difficultés qu'ont les cliniciens à prédire le devenir des patients victimes d'un AVC.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (HAS) HAS (2012) Accident vasculaire cérébral : méthodes de rééducation de la fonction motrice chez l'adulte.
- Abboud H, Labreuche J, Plouin F, Amarenco P, Investigators G (2006) High blood pressure in early acute stroke: a sign of a poor outcome? *Journal of hypertension* 24:381-386.
- Abe Y, Nakamura H, Yoshino O, Oya T, Kimura T (2003) Decreased neural damage after spinal cord injury in tPA-deficient mice. *Journal of neurotrauma* 20:43-57.
- Aboa-Eboule C, Bejot Y, Osseby GV, Rouaud O, Binquet C, Marie C, Cottin Y, Giroud M, Bonithon-Kopp C (2011) Influence of prior transient ischaemic attack on stroke prognosis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 82:993-1000.
- Acheampong P, Ford GA (2012) Pharmacokinetics of alteplase in the treatment of ischaemic stroke. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 8:271-281.
- Acler M, Robol E, Fiaschi A, Manganotti P (2009) A double blind placebo RCT to investigate the effects of serotonergic modulation on brain excitability and motor recovery in stroke patients. *Journal of neurology* 256:1152-1158.
- Adams HP, Jr., Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE, 3rd (1993) Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 24:35-41.
- Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, Johnson J, Destree A, Lazarus DD, Maas J, Pien CS, Prakash S, Elliott PJ (1999) Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer research* 59:2615-2622.
- Adibhatla RM, Hatcher JF (2008) Tissue plasminogen activator (tPA) and matrix metalloproteinases in the pathogenesis of stroke: therapeutic strategies. *CNS & neurological disorders drug targets* 7:243-253.
- Ahmed R, Zuberi BF, Afsar S (2004) Stroke scale score and early prediction of outcome after stroke. *Journal of the College of Physicians and Surgeons--Pakistan : JCPSP* 14:267-269.
- Aid T, Kazantseva A, Piirsoo M, Palm K, Timmusk T (2007) Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *Journal of neuroscience research* 85:525-535.
- Akaneya Y, Tsumoto T, Kinoshita S, Hatanaka H (1997) Brain-derived neurotrophic factor enhances long-term potentiation in rat visual cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17:6707-6716.
- Akazawa C, Shigemoto R, Bessho Y, Nakanishi S, Mizuno N (1994) Differential expression of five N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the cerebellum of developing and adult rats. *The Journal of comparative neurology* 347:150-160.
- Alano CC, Kauppinen TM, Valls AV, Swanson RA (2006) Minocycline inhibits poly(ADP-ribose) polymerase-1 at nanomolar concentrations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:9685-9690.
- Albers GW, Thijs VN, Wechsler L, Kemp S, Schlaug G, Skalabrin E, Bammer R, Kakuda W, Lansberg MG, Shuaib A, Coplin W, Hamilton S, Moseley M, Marks MP, Investigators D (2006) Magnetic resonance imaging profiles predict clinical response to early reperfusion: the diffusion and perfusion imaging evaluation for understanding stroke evolution (DEFUSE) study. *Annals of neurology* 60:508-517.
- Alberts BJ, A. ; Lewis, J. ; Raff, M. ; Roberts, K. ; Walter, P. (2007) *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science.
- Amantea D, Nappi G, Bernardi G, Bagetta G, Corasaniti MT (2009) Post-ischemic brain damage: pathophysiology and role of inflammatory mediators. *The FEBS journal* 276:13-26.
- Amaro S, Canovas D, Castellanos M, Gallego J, Marti-Febregas J, Segura T, Chamorro A (2010) The URICO-ICTUS study, a phase 3 study of combined treatment with uric acid and rtPA administered intravenously in acute ischaemic stroke patients within the first 4.5 h of onset of symptoms. *International journal of stroke : official journal of the International Stroke Society* 5:325-328.

- Amaro S, Soy D, Obach V, Cervera A, Planas AM, Chamorro A (2007) A pilot study of dual treatment with recombinant tissue plasminogen activator and uric acid in acute ischemic stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 38:2173-2175.
- Ambrogini P, Lattanzi D, Ciuffoli S, Betti M, Fanelli M, Cuppini R (2013) Physical exercise and environment exploration affect synaptogenesis in adult-generated neurons in the rat dentate gyrus: possible role of BDNF. *Brain research* 1534:1-12.
- Anand N, Stead LG (2005) Neuron-specific enolase as a marker for acute ischemic stroke: a systematic review. *Cerebrovasc Dis* 20:213-219.
- Anastasia A, Deinhardt K, Chao MV, Will NE, Irmady K, Lee FS, Hempstead BL, Bracken C (2013) Val66Met polymorphism of BDNF alters prodomain structure to induce neuronal growth cone retraction. *Nature communications* 4:2490.
- Ando T, Takagi N, Takagi K, Kago T, Takeo S (2005) Effects of nefiracetam on the levels of brain-derived neurotrophic factor and synapsin I mRNA and protein in the hippocampus of microsphere-embolized rats. *European journal of pharmacology* 507:49-56.
- Ansar S, Chatzikonstantinou E, Thiagarajah R, Tritschler L, Fatar M, Hennerici MG, Meairs S (2014) Pro-inflammatory mediators and apoptosis correlate to rt-PA response in a novel mouse model of thromboembolic stroke. *PloS one* 9:e85849.
- Aoki T, Sumii T, Mori T, Wang X, Lo EH (2002) Blood-brain barrier disruption and matrix metalloproteinase-9 expression during reperfusion injury: mechanical versus embolic focal ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 33:2711-2717.
- Asahi M, Asahi K, Jung JC, del Zoppo GJ, Fini ME, Lo EH (2000) Role for matrix metalloproteinase 9 after focal cerebral ischemia: effects of gene knockout and enzyme inhibition with BB-94. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 20:1681-1689.
- Autry AE, Monteggia LM (2012) Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. *Pharmacological reviews* 64:238-258.
- Bagg S, Pombo AP, Hopman W (2002) Effect of age on functional outcomes after stroke rehabilitation. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 33:179-185.
- Bahi A, Dreyer JL (2012) Hippocampus-specific deletion of tissue plasminogen activator "tPA" in adult mice impairs depression- and anxiety-like behaviors. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 22:672-682.
- Baker JB, Gronke RS (1986) Protease nexins and cellular regulation. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 12:216-220.
- Banerjee J, Ghosh S (2004) Interaction of mitochondrial voltage-dependent anion channel from rat brain with plasminogen protein leads to partial closure of the channel. *Biochimica et biophysica acta* 1663:6-8.
- Baranes D, Lederfein D, Huang YY, Chen M, Bailey CH, Kandel ER (1998) Tissue plasminogen activator contributes to the late phase of LTP and to synaptic growth in the hippocampal mossy fiber pathway. *Neuron* 21:813-825.
- Barde YA, Edgar D, Thoenen H (1982) Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *The EMBO journal* 1:549-553.
- Barker-Carlson K, Lawrence DA, Schwartz BS (2002) Acyl-enzyme complexes between tissue-type plasminogen activator and neuroserpin are short-lived in vitro. *J Biol Chem* 277:46852-46857.
- Barker PA (2009) Whither proBDNF? *Nature neuroscience* 12:105-106.
- Baron A, Montagne A, Casse F, Launay S, Maubert E, Ali C, Vivien D (2010) NR2D-containing NMDA receptors mediate tissue plasminogen activator-promoted neuronal excitotoxicity. *Cell death and differentiation* 17:860-871.
- Bath KG, Jing DQ, Dincheva I, Neeb CC, Pattwell SS, Chao MV, Lee FS, Ninan I (2012) BDNF Val66Met impairs fluoxetine-induced enhancement of adult hippocampus plasticity.

- Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology 37:1297-1304.
- Beck T, Lindholm D, Castren E, Wree A (1994) Brain-derived neurotrophic factor protects against ischemic cell damage in rat hippocampus. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 14:689-692.
- Begliumini S, Casarosa E, Pluchino N, Lenzi E, Centofanti M, Freschi L, Pieri M, Genazzani AD, Luisi S, Genazzani AR (2007) Influence of endogenous and exogenous sex hormones on plasma brain-derived neurotrophic factor. *Hum Reprod* 22:995-1002.
- Begliumini S, Lenzi E, Ninni F, Casarosa E, Merlini S, Pluchino N, Valentino V, Luisi S, Luisi M, Genazzani AR (2008) Plasma brain-derived neurotrophic factor daily variations in men: correlation with cortisol circadian rhythm. *J Endocrinol* 197:429-435.
- Beishuizen A, Hartemink KJ, Vermes I, Groeneveld AJ (2005) Circulating cardiovascular markers and mediators in acute illness: an update. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 354:21-34.
- Bejot Y, Aboa-Eboule C, Marie C, Giroud M (2011a) [Neuroprotective effect of transient ischemic attack]. *Presse medicale* 40:167-172.
- Bejot Y, Mossiat C, Giroud M, Prigent-Tessier A, Marie C (2011b) Circulating and brain BDNF levels in stroke rats. Relevance to clinical studies. *PloS one* 6:e29405.
- Bejot Y, Prigent-Tessier A, Cachia C, Giroud M, Mossiat C, Bertrand N, Garnier P, Marie C (2011c) Time-dependent contribution of non neuronal cells to BDNF production after ischemic stroke in rats. *Neurochemistry international* 58:102-111.
- Bejot Y, Rouaud O, Durier J, Caillier M, Marie C, Freysz M, Yeguiayan JM, Chantegret A, Osseby G, Moreau T, Giroud M (2007) Decrease in the stroke case fatality rates in a French population-based twenty-year study. A comparison between men and women. *Cerebrovasc Dis* 24:439-444.
- Bejot Y, Touze E, Jacquin A, Giroud M, Mas JL (2009) [Epidemiology of stroke]. *Medecine sciences : M/S* 25:727-732.
- Benchenane K, Berezowski V, Ali C, Fernandez-Monreal M, Lopez-Atalaya JP, Brillault J, Chuquet J, Nouvelot A, MacKenzie ET, Bu G, Cecchelli R, Touzani O, Vivien D (2005) Tissue-type plasminogen activator crosses the intact blood-brain barrier by low-density lipoprotein receptor-related protein-mediated transcytosis. *Circulation* 111:2241-2249.
- Benchenane K, Castel H, Boulouard M, Bluthe R, Fernandez-Monreal M, Roussel BD, Lopez-Atalaya JP, Butt-Gueulle S, Agin V, Maubert E, Dantzer R, Touzani O, Dauphin F, Vivien D, Ali C (2007) Anti-NR1 N-terminal-domain vaccination unmasks the crucial action of tPA on NMDA-receptor-mediated toxicity and spatial memory. *Journal of cell science* 120:578-585.
- Benchenane K, Lopez-Atalaya JP, Fernandez-Monreal M, Touzani O, Vivien D (2004) Equivocal roles of tissue-type plasminogen activator in stroke-induced injury. *Trends in neurosciences* 27:155-160.
- Biffo S, Offenhauser N, Carter BD, Barde YA (1995) Selective binding and internalisation by truncated receptors restrict the availability of BDNF during development. *Development* 121:2461-2470.
- Binder BR, Spragg J, Austen KF (1979) Purification and characterization of human vascular plasminogen activator derived from blood vessel perfusates. *The Journal of biological chemistry* 254:1998-2003.
- Boreas AM, Lodder J, Kessels F, de Leeuw PW, Troost J (2002) Prognostic value of blood pressure in acute stroke. *Journal of human hypertension* 16:111-116.
- Boulaftali Y, Ho-Tin-Noe B, Pena A, Loyau S, Venisse L, Francois D, Richard B, Arocas V, Collet JP, Jandrot-Perrus M, Bouton MC (2011) Platelet protease nexin-1, a serpin that strongly influences fibrinolysis and thrombolysis. *Circulation* 123:1326-1334.
- Boulle F, van den Hove DL, Jakob SB, Rutten BP, Hamon M, van Os J, Lesch KP, Lanfumey L, Steinbusch HW, Kenis G (2012) Epigenetic regulation of the BDNF gene: implications for psychiatric disorders. *Molecular psychiatry* 17:584-596.

- Bouras G, Deftereos S, Tousoulis D, Giannopoulos G, Chatzis G, Tsounis D, Cleman MW, Stefanadis C (2013) Asymmetric Dimethylarginine (ADMA): a promising biomarker for cardiovascular disease? *Current topics in medicinal chemistry* 13:180-200.
- Bouton MC, Boulaftali Y, Richard B, Arocas V, Michel JB, Jandrot-Perrus M (2012) Emerging role of serpinE2/protease nexin-1 in hemostasis and vascular biology. *Blood* 119:2452-2457.
- Bramham CR, Messaoudi E (2005) BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. *Progress in neurobiology* 76:99-125.
- Brickley SG, Misra C, Mok MH, Mishina M, Cull-Candy SG (2003) NR2B and NR2D subunits coassemble in cerebellar Golgi cells to form a distinct NMDA receptor subtype restricted to extrasynaptic sites. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:4958-4966.
- Brigadski T, Hartmann M, Lessmann V (2005) Differential vesicular targeting and time course of synaptic secretion of the mammalian neurotrophins. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:7601-7614.
- Brown NJ, Gainer JV, Murphey LJ, Vaughan DE (2000) Bradykinin stimulates tissue plasminogen activator release from human forearm vasculature through B(2) receptor-dependent, NO synthase-independent, and cyclooxygenase-independent pathway. *Circulation* 102:2190-2196.
- Bu G, Maksymovitch EA, Nerbonne JM, Schwartz AL (1994) Expression and function of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) in mammalian central neurons. *The Journal of biological chemistry* 269:18521-18528.
- Bus BA, Molendijk ML, Penninx BJ, Buitelaar JK, Kenis G, Prickaerts J, Elzinga BM, Voshaar RC (2011) Determinants of serum brain-derived neurotrophic factor. *Psychoneuroendocrinology* 36:228-239.
- Calmels P, Defay C, Yvanes-Thomas M, Laporte S, Fayolle-Minon I, Bethoux F, Blanchon MA, Gonthier R (2005) [Is very old age a prognostic factor for outcome after a first stroke?]. *Annales de readaptation et de medecine physique : revue scientifique de la Societe francaise de reeducation fonctionnelle de readaptation et de medecine physique* 48:675-681.
- Capes SE, Hunt D, Malmberg K, Pathak P, Gerstein HC (2001) Stress hyperglycemia and prognosis of stroke in nondiabetic and diabetic patients: a systematic overview. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 32:2426-2432.
- Caporali A, Emanuelli C (2009) Cardiovascular actions of neurotrophins. *Physiol Rev* 89:279-308.
- Cappellari M, Deluca C, Tinazzi M, Tomelleri G, Carletti M, Fiaschi A, Bovi P, Moretto G (2011) Does statin in the acute phase of ischemic stroke improve outcome after intravenous thrombolysis? A retrospective study. *Journal of the neurological sciences* 308:128-134.
- Carmeliet P, Schoonjans L, Kieckens L, Ream B, Degen J, Bronson R, De Vos R, van den Oord JJ, Collen D, Mulligan RC (1994) Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice. *Nature* 368:419-424.
- Carter AR, Chen C, Schwartz PM, Segal RA (2002) Brain-derived neurotrophic factor modulates cerebellar plasticity and synaptic ultrastructure. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22:1316-1327.
- Cauraugh JH, Naik SK, Lodha N, Coombes SA, Summers JJ (2011) Long-term rehabilitation for chronic stroke arm movements: a randomized controlled trial. *Clinical rehabilitation* 25:1086-1096.
- Chaldakov GN, Fiore M, Stankulov IS, Manni L, Hristova MG, Antonelli A, Ghenev PI, Aloe L (2004) Neurotrophin presence in human coronary atherosclerosis and metabolic syndrome: a role for NGF and BDNF in cardiovascular disease? *Progress in brain research* 146:279-289.
- Cheeran B, Talelli P, Mori F, Koch G, Suppa A, Edwards M, Houlden H, Bhatia K, Greenwood R, Rothwell JC (2008) A common polymorphism in the brain-derived neurotrophic factor gene (BDNF) modulates human cortical plasticity and the response to rTMS. *The Journal of physiology* 586:5717-5725.

- Chen H, Yoshioka H, Kim GS, Jung JE, Okami N, Sakata H, Maier CM, Narasimhan P, Goeders CE, Chan PH (2011) Oxidative stress in ischemic brain damage: mechanisms of cell death and potential molecular targets for neuroprotection. *Antioxidants & redox signaling* 14:1505-1517.
- Chen J, Li Y, Chopp M (2000) Intracerebral transplantation of bone marrow with BDNF after MCAo in rat. *Neuropharmacology* 39:711-716.
- Chen J, Regan RF (2005) Increasing expression of heme oxygenase-1 by proteasome inhibition protects astrocytes from heme-mediated oxidative injury. *Current neurovascular research* 2:189-196.
- Chen J, Zhang C, Jiang H, Li Y, Zhang L, Robin A, Katakowski M, Lu M, Chopp M (2005a) Atorvastatin induction of VEGF and BDNF promotes brain plasticity after stroke in mice. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 25:281-290.
- Chen ZY, Bath K, McEwen B, Hempstead B, Lee F (2008) Impact of genetic variant BDNF (Val66Met) on brain structure and function. *Novartis Foundation symposium* 289:180-188; discussion 188-195.
- Chen ZY, Ieraci A, Teng H, Dall H, Meng CX, Herrera DG, Nykjaer A, Hempstead BL, Lee FS (2005b) Sortilin controls intracellular sorting of brain-derived neurotrophic factor to the regulated secretory pathway. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:6156-6166.
- Chen ZY, Patel PD, Sant G, Meng CX, Teng KK, Hempstead BL, Lee FS (2004) Variant brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Met66) alters the intracellular trafficking and activity-dependent secretion of wild-type BDNF in neurosecretory cells and cortical neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24:4401-4411.
- Cheng B, Mattson MP (1994) NT-3 and BDNF protect CNS neurons against metabolic/excitotoxic insults. *Brain research* 640:56-67.
- Chollet F, Tardy J, Albucher JF, Thalamas C, Berard E, Lamy C, Bejot Y, Deltour S, Jaillard A, Niclot P, Guillon B, Moulin T, Marque P, Pariente J, Arnaud C, Loubinoux I (2011) Fluoxetine for motor recovery after acute ischaemic stroke (FLAME): a randomised placebo-controlled trial. *Lancet neurology* 10:123-130.
- Chourbaji S, Brandwein C, Gass P (2011) Altering BDNF expression by genetics and/or environment: impact for emotional and depression-like behaviour in laboratory mice. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 35:599-611.
- Clark WM, Wissman S, Albers GW, Jhamandas JH, Madden KP, Hamilton S (1999) Recombinant tissue-type plasminogen activator (Alteplase) for ischemic stroke 3 to 5 hours after symptom onset. The ATLANTIS Study: a randomized controlled trial. Alteplase Thrombolysis for Acute Noninterventional Therapy in Ischemic Stroke. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 282:2019-2026.
- Cohen-Cory S, Kidane AH, Shirkey NJ, Marshak S (2010) Brain-derived neurotrophic factor and the development of structural neuronal connectivity. *Developmental neurobiology* 70:271-288.
- Collen D, Lijnen HR (2004) Tissue-type plasminogen activator: a historical perspective and personal account. *J Thromb Haemost* 2:541-546.
- Collen D, Lijnen HR, Bulens F, Vandamme AM, Tulinsky A, Nelles L (1990) Biochemical and functional characterization of human tissue-type plasminogen activator variants with mutagenized kringle domains. *The Journal of biological chemistry* 265:12184-12191.
- Collen D, Stassen JM, Larsen G (1988) Pharmacokinetics and thrombolytic properties of deletion mutants of human tissue-type plasminogen activator in rabbits. *Blood* 71:216-219.
- Comelli MC, Seren MS, Guidolin D, Manev RM, Favaron M, Rimland JM, Canella R, Negro A, Manev H (1992) Photochemical stroke and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression. *Neuroreport* 3:473-476.
- Coppell AL, Pei Q, Zetterstrom TS (2003) Bi-phasic change in BDNF gene expression following antidepressant drug treatment. *Neuropharmacology* 44:903-910.

- Correa F, Gauberti M, Parcq J, Macrez R, Hommet Y, Obiang P, Hernangomez M, Montagne A, Liot G, Guaza C, Maubert E, Ali C, Vivien D, Docagne F (2011) Tissue plasminogen activator prevents white matter damage following stroke. *The Journal of experimental medicine* 208:1229-1242.
- Cronin CA (2010) Intravenous tissue plasminogen activator for stroke: a review of the ECASS III results in relation to prior clinical trials. *The Journal of emergency medicine* 38:99-105.
- Cross AR, Segal AW (2004) The NADPH oxidase of professional phagocytes--prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochimica et biophysica acta* 1657:1-22.
- Cuadrado E, Ortega L, Hernandez-Guillamon M, Penalba A, Fernandez-Cadenas I, Rosell A, Montaner J (2008) Tissue plasminogen activator (t-PA) promotes neutrophil degranulation and MMP-9 release. *Journal of leukocyte biology* 84:207-214.
- Cull-Candy SG, Leszkiewicz DN (2004) Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2004:re16.
- Dalkara T, Yoshida T, Irikura K, Moskowitz MA (1994) Dual role of nitric oxide in focal cerebral ischemia. *Neuropharmacology* 33:1447-1452.
- Dam M, Tonin P, De Boni A, Pizzolato G, Casson S, Ermani M, Freo U, Piron L, Battistin L (1996) Effects of fluoxetine and maprotiline on functional recovery in poststroke hemiplegic patients undergoing rehabilitation therapy. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 27:1211-1214.
- Daniel PB, Lux W, Samson AL, Schleuning WD, Niego B, Weiss TW, Tjarnlund-Wolf A, Medcalf RL (2007) Two conserved regions within the tissue-type plasminogen activator gene promoter mediate regulation by brain-derived neurotrophic factor. *The FEBS journal* 274:2411-2423.
- Dassan P, Keir G, Brown MM (2009) Criteria for a clinically informative serum biomarker in acute ischaemic stroke: a review of S100B. *Cerebrovasc Dis* 27:295-302.
- de Serrano VS, Castellino FJ (1990) Structural determinants of the noncatalytic chain of tissue-type plasminogen activator that modulate its association rate with plasminogen activator inhibitor-1. *The Journal of biological chemistry* 265:10473-10478.
- del Zoppo GJ (2009) Relationship of neurovascular elements to neuron injury during ischemia. *Cerebrovasc Dis* 27 Suppl 1:65-76.
- del Zoppo GJ, Mabuchi T (2003) Cerebral microvessel responses to focal ischemia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 23:879-894.
- Demougeot C, Bertrand N, Prigent-Tessier A, Garnier P, Mossiat C, Giroud M, Marie C, Beley A (2003) Reversible loss of N-acetyl-aspartate in rats subjected to long-term focal cerebral ischemia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 23:482-489.
- Derex L, Nighoghossian N (2008) Intracerebral haemorrhage after thrombolysis for acute ischaemic stroke: an update. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 79:1093-1099.
- Di Lazzaro V, Profice P, Pilato F, Dileone M, Florio L, Tonali PA, Angelucci F (2007) BDNF plasma levels in acute stroke. *Neuroscience letters* 422:128-130.
- Di Napoli M, Schwaninger M, Cappelli R, Ceccarelli E, Di Gianfilippo G, Donati C, Emsley HC, Forconi S, Hopkins SJ, Masotti L, Muir KW, Paciucci A, Papa F, Roncacci S, Sander D, Sander K, Smith CJ, Stefanini A, Weber D (2005) Evaluation of C-reactive protein measurement for assessing the risk and prognosis in ischemic stroke: a statement for health care professionals from the CRP Pooling Project members. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 36:1316-1329.
- Diamond SL, Sharefkin JB, Dieffenbach C, Frasier-Scott K, McIntire LV, Eskin SG (1990) Tissue plasminogen activator messenger RNA levels increase in cultured human endothelial cells exposed to laminar shear stress. *Journal of cellular physiology* 143:364-371.
- Dias BG, Banerjee SB, Duman RS, Vaidya VA (2003) Differential regulation of brain derived neurotrophic factor transcripts by antidepressant treatments in the adult rat brain. *Neuropharmacology* 45:553-563.
- Diener HC, Lees KR, Lyden P, Grotta J, Davalos A, Davis SM, Shuaib A, Ashwood T, Wasiewski W, Alderfer V, Hardemark HG, Rodichok L, Saint I, Investigators II (2008) NXY-059 for the

- treatment of acute stroke: pooled analysis of the SAINT I and II Trials. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 39:1751-1758.
- Dijkhuizen RM, Asahi M, Wu O, Rosen BR, Lo EH (2002) Rapid breakdown of microvascular barriers and subsequent hemorrhagic transformation after delayed recombinant tissue plasminogen activator treatment in a rat embolic stroke model. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 33:2100-2104.
- Ding-Zhou L, Marchand-Verrecchia C, Palmier B, Croci N, Chabrier PE, Plotkine M, Margail I (2003) Neuroprotective effects of (S)-N-[4-[4-[(3,4-Dihydro-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-2H-1-benzopyran-2-yl)carbonyl]-1-piperazinyl]phenyl]-2-thiophenecarboximidamide (BN 80933), an inhibitor of neuronal nitric-oxide synthase and an antioxidant, in model of transient focal cerebral ischemia in mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 306:588-594.
- Ding Q, Ying Z, Gomez-Pinilla F (2011) Exercise influences hippocampal plasticity by modulating brain-derived neurotrophic factor processing. *Neuroscience* 192:773-780.
- Dirnagl U, Becker K, Meisel A (2009) Preconditioning and tolerance against cerebral ischaemia: from experimental strategies to clinical use. *Lancet neurology* 8:398-412.
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in neurosciences* 22:391-397.
- Donnan GA, Baron JC, Ma H, Davis SM (2009) Penumbra selection of patients for trials of acute stroke therapy. *Lancet neurology* 8:261-269.
- Dore S, Otsuka T, Mito T, Sugo N, Hand T, Wu L, Hurn PD, Traystman RJ, Andreasson K (2003) Neuronal overexpression of cyclooxygenase-2 increases cerebral infarction. *Annals of neurology* 54:155-162.
- Downing AK, Driscoll PC, Harvey TS, Dudgeon TJ, Smith BO, Baron M, Campbell ID (1992) Solution structure of the fibrin binding finger domain of tissue-type plasminogen activator determined by 1H nuclear magnetic resonance. *Journal of molecular biology* 225:821-833.
- Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP (2008) Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology* 55:310-318.
- Drake CT, Milner TA, Patterson SL (1999) Ultrastructural localization of full-length trkB immunoreactivity in rat hippocampus suggests multiple roles in modulating activity-dependent synaptic plasticity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19:8009-8026.
- Dreger H, Westphal K, Wilck N, Baumann G, Stangl V, Stangl K, Meiners S (2010) Protection of vascular cells from oxidative stress by proteasome inhibition depends on Nrf2. *Cardiovascular research* 85:395-403.
- Du K, Montminy M (1998) CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *The Journal of biological chemistry* 273:32377-32379.
- Dwivedi Y (2013) Involvement of brain-derived neurotrophic factor in late-life depression. *The American journal of geriatric psychiatry : official journal of the American Association for Geriatric Psychiatry* 21:433-449.
- Echeverry R, Wu J, Haile WB, Guzman J, Yepes M (2010) Tissue-type plasminogen activator is a neuroprotectant in the mouse hippocampus. *The Journal of clinical investigation* 120:2194-2205.
- Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A, Zaitsev E, Gold B, Goldman D, Dean M, Lu B, Weinberger DR (2003) The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell* 112:257-269.
- Ehrenreich H, Weissenborn K, Prange H, Schneider D, Weimar C, Wartenberg K, Schellinger PD, Bohn M, Becker H, Wegrzyn M, Jahnig P, Herrmann M, Knauth M, Bahr M, Heide W, Wagner A, Schwab S, Reichmann H, Schwendemann G, Dengler R, Kastrup A, Bartels C, Group EPOST (2009) Recombinant human erythropoietin in the treatment of acute ischemic stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 40:e647-656.

- el-Sayed MS (1996) Effects of exercise on blood coagulation, fibrinolysis and platelet aggregation. *Sports medicine* 22:282-298.
- Elfving B, Plougmann PH, Muller HK, Mathe AA, Rosenberg R, Wegener G (2010) Inverse correlation of brain and blood BDNF levels in a genetic rat model of depression. *Int J Neuropsychopharmacol* 13:563-572.
- Emeis JJ (1992) Regulation of the acute release of tissue-type plasminogen activator from the endothelium by coagulation activation products. *Annals of the New York Academy of Sciences* 667:249-258.
- Endres M, Fan G, Hirt L, Fujii M, Matsushita K, Liu X, Jaenisch R, Moskowitz MA (2000) Ischemic brain damage in mice after selectively modifying BDNF or NT4 gene expression. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 20:139-144.
- Enstrom A, C. Onore, A. Tarver, I. Hertz-Picciotto and R. Hansen et al. (2008) Peripheral Blood Leukocyte Production of BDNF following Mitogen Stimulation in Early Onset and Regressive Autism. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 4:121-129.
- Erickson KI, Prakash RS, Voss MW, Chaddock L, Heo S, McLaren M, Pence BD, Martin SA, Vieira VJ, Woods JA, McAuley E, Kramer AF (2010) Brain-derived neurotrophic factor is associated with age-related decline in hippocampal volume. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:5368-5375.
- Ernfors P, Wetmore C, Olson L, Persson H (1990) Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. *Neuron* 5:511-526.
- Esteban I, Hannestad J, Levanti B, Del Valle ME, Naves FJ, Vega JA (1995) Neurotrophin receptor proteins immunoreactivity in human gastrointestinal endocrine cells. *Brain research bulletin* 38:539-543.
- Evans SF, Irmady K, Ostrow K, Kim T, Nykjaer A, Saftig P, Blobel C, Hempstead BL (2011) Neuronal brain-derived neurotrophic factor is synthesized in excess, with levels regulated by sortilin-mediated trafficking and lysosomal degradation. *The Journal of biological chemistry* 286:29556-29567.
- Fan X, Yu Z, Liu J, Liu N, Hajjar KA, Furie KL, Lo EH, Wang X (2010) Annexin A2: a tissue plasminogen activator amplifier for thrombolytic stroke therapy. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 41:S54-58.
- Feeney DM, Gonzalez A, Law WA (1982) Amphetamine, haloperidol, and experience interact to affect rate of recovery after motor cortex injury. *Science* 217:855-857.
- Feigin VL, Lawes CM, Bennett DA, Barker-Collo SL, Parag V (2009) Worldwide stroke incidence and early case fatality reported in 56 population-based studies: a systematic review. *Lancet neurology* 8:355-369.
- Fenner BM (2012) Truncated TrkB: beyond a dominant negative receptor. *Cytokine & growth factor reviews* 23:15-24.
- Fernandez-Monreal M, Lopez-Atalaya JP, Benchenane K, Cacquevel M, Dulin F, Le Caer JP, Rossier J, Jarrige AC, Mackenzie ET, Colloc'h N, Ali C, Vivien D (2004a) Arginine 260 of the amino-terminal domain of NR1 subunit is critical for tissue-type plasminogen activator-mediated enhancement of N-methyl-D-aspartate receptor signaling. *The Journal of biological chemistry* 279:50850-50856.
- Fernandez-Monreal M, Lopez-Atalaya JP, Benchenane K, Leveille F, Cacquevel M, Plawinski L, MacKenzie ET, Bu G, Buisson A, Vivien D (2004b) Is tissue-type plasminogen activator a neuromodulator? *Mol Cell Neurosci* 25:594-601.
- Ferris LT, Williams JS, Shen CL (2007) The effect of acute exercise on serum brain-derived neurotrophic factor levels and cognitive function. *Medicine and science in sports and exercise* 39:728-734.
- Fiebach JB, Al-Rawi Y, Wintermark M, Furlan AJ, Rowley HA, Lindsten A, Smyej J, Eng P, Warach S, Pedraza S (2012) Vascular occlusion enables selecting acute ischemic stroke patients for treatment with desmoteplase. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 43:1561-1566.

- Fillebeen C, Descamps L, Dehouck MP, Fenart L, Benaissa M, Spik G, Cecchelli R, Pierce A (1999) Receptor-mediated transcytosis of lactoferrin through the blood-brain barrier. *The Journal of biological chemistry* 274:7011-7017.
- Fiumelli H, Jabaudon D, Magistretti PJ, Martin JL (1999) BDNF stimulates expression, activity and release of tissue-type plasminogen activator in mouse cortical neurons. *The European journal of neuroscience* 11:1639-1646.
- Flavin MP, Zhao G, Ho LT (2000) Microglial tissue plasminogen activator (tPA) triggers neuronal apoptosis in vitro. *Glia* 29:347-354.
- Fredriksson L, Ehnman M, Fieber C, Eriksson U (2005) Structural requirements for activation of latent platelet-derived growth factor CC by tissue plasminogen activator. *The Journal of biological chemistry* 280:26856-26862.
- Fredriksson L, Li H, Fieber C, Li X, Eriksson U (2004) Tissue plasminogen activator is a potent activator of PDGF-CC. *The EMBO journal* 23:3793-3802.
- Fregni F, Boggio PS, Valle AC, Rocha RR, Duarte J, Ferreira MJ, Wagner T, Fecteau S, Rigonatti SP, Riberto M, Freedman SD, Pascual-Leone A (2006) A sham-controlled trial of a 5-day course of repetitive transcranial magnetic stimulation of the unaffected hemisphere in stroke patients. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 37:2115-2122.
- Frelin C, Vigne P, Ladoux A, Lazdunski M (1988) The regulation of the intracellular pH in cells from vertebrates. *European journal of biochemistry / FEBS* 174:3-14.
- Friedman GC, Seeds NW (1995) Tissue plasminogen activator mRNA expression in granule neurons coincides with their migration in the developing cerebellum. *The Journal of comparative neurology* 360:658-670.
- Fujimura H, Altar CA, Chen R, Nakamura T, Nakahashi T, Kambayashi J, Sun B, Tandon NN (2002) Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation. *Thrombosis and haemostasis* 87:728-734.
- Furlan AJ, Eyding D, Albers GW, Al-Rawi Y, Lees KR, Rowley HA, Sachara C, Soehngen M, Warach S, Hacke W, Investigators D (2006) Dose Escalation of Desmoteplase for Acute Ischemic Stroke (DEDAS): evidence of safety and efficacy 3 to 9 hours after stroke onset. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 37:1227-1231.
- Furtmuller R, Schlag MG, Berger M, Hopf R, Huck S, Sieghart W, Redl H (2002) Tranexamic acid, a widely used antifibrinolytic agent, causes convulsions by a gamma-aminobutyric acid(A) receptor antagonistic effect. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 301:168-173.
- Garcia-Rocha M, Avila J, Armas-Portela R (1994) Tissue-type plasminogen activator (tPA) is the main plasminogen activator associated with isolated rat nerve growth cones. *Neuroscience letters* 180:123-126.
- Gerke V, Creutz CE, Moss SE (2005) Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nature reviews Molecular cell biology* 6:449-461.
- Ghiadoni L, Taddei S, Virdis A (2012) Hypertension and endothelial dysfunction: therapeutic approach. *Current vascular pharmacology* 10:42-60.
- Ginsberg MD (1993) Emerging strategies for the treatment of ischemic brain injury. *Research publications - Association for Research in Nervous and Mental Disease* 71:207-237.
- Gladding CM, Raymond LA (2011) Mechanisms underlying NMDA receptor synaptic/extrasynaptic distribution and function. *Molecular and cellular neurosciences* 48:308-320.
- Gold SM, Schulz KH, Hartmann S, Mladek M, Lang UE, Hellweg R, Reer R, Braumann KM, Heesen C (2003) Basal serum levels and reactivity of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor to standardized acute exercise in multiple sclerosis and controls. *Journal of neuroimmunology* 138:99-105.
- Golden E, Emiliano A, Maudsley S, Windham BG, Carlson OD, Egan JM, Driscoll I, Ferrucci L, Martin B, Mattson MP (2010) Circulating brain-derived neurotrophic factor and indices of metabolic and cardiovascular health: data from the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *PLoS one* 5:e10099.

- Goldstein LB, Bushnell CD, Adams RJ, Appel LJ, Braun LT, Chaturvedi S, Creager MA, Culebras A, Eckel RH, Hart RG, Hinchey JA, Howard VJ, Jauch EC, Levine SR, Meschia JF, Moore WS, Nixon JV, Pearson TA, American Heart Association Stroke C, Council on Cardiovascular N, Council on E, Prevention, Council for High Blood Pressure R, Council on Peripheral Vascular D, Interdisciplinary Council on Quality of C, Outcomes R (2011) Guidelines for the primary prevention of stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 42:517-584.
- Gomez-Palacio Schjetnan A, Escobar-Rodriguez ML (2007) [Memory coding and retention: brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in synaptic plasticity]. *Revista de neurologia* 45:409-417.
- Gonzalez-Gronow M, Ray R, Wang F, Pizzo SV (2013) The voltage-dependent anion channel (VDAC) binds tissue-type plasminogen activator and promotes activation of plasminogen on the cell surface. *The Journal of biological chemistry* 288:498-509.
- Gottlieb M, Bonova P, Danielisova V, Nemethova M, Burda J, Cizkova D (2013) Brain-derived neurotrophic factor blood levels in two models of transient brain ischemia in rats. *General physiology and biophysics* 32:139-142.
- Govoni S, Masoero E, Favalli L, Rozza A, Scelsi R, Viappiani S, Buccellati C, Sala A, Folco G (2001) The Cyclooxygenase-2 inhibitor SC58236 is neuroprotective in an in vivo model of focal ischemia in the rat. *Neuroscience letters* 303:91-94.
- Gravanis I, Tsirka SE (2008) Tissue-type plasminogen activator as a therapeutic target in stroke. *Expert Opin Ther Targets* 12:159-170.
- Greenberg ME, Xu B, Lu B, Hempstead BL (2009) New insights in the biology of BDNF synthesis and release: implications in CNS function. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:12764-12767.
- Greer DM, Funk SE, Reaven NL, Ouzounelli M, Uman GC (2008) Impact of fever on outcome in patients with stroke and neurologic injury: a comprehensive meta-analysis. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 39:3029-3035.
- Griesbach GS, Hovda DA, Molteni R, Wu A, Gomez-Pinilla F (2004) Voluntary exercise following traumatic brain injury: brain-derived neurotrophic factor upregulation and recovery of function. *Neuroscience* 125:129-139.
- Griesbeck O, Parsadanian AS, Sendtner M, Thoenen H (1995) Expression of neurotrophins in skeletal muscle: quantitative comparison and significance for motoneuron survival and maintenance of function. *J Neurosci Res* 42:21-33.
- Griffin EW, Mullally S, Foley C, Warmington SA, O'Mara SM, Kelly AM (2011) Aerobic exercise improves hippocampal function and increases BDNF in the serum of young adult males. *Physiology & behavior* 104:934-941.
- Group NS (1995) Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. *The New England journal of medicine* 333:1581-1587.
- Gualandris A, Jones TE, Strickland S, Tsirka SE (1996) Membrane depolarization induces calcium-dependent secretion of tissue plasminogen activator. *J Neurosci* 16:2220-2225.
- Gutierrez M, Diez Tejedor E, Alonso de Lecinana M, Fuentes B, Carceller F, Roda JM (2006) Thrombolysis and neuroprotection in cerebral ischemia. *Cerebrovasc Dis* 21 Suppl 2:118-126.
- Hacke W, Albers G, Al-Rawi Y, Bogousslavsky J, Davalos A, Eliasziw M, Fischer M, Furlan A, Kaste M, Lees KR, Soehngen M, Warach S, Group DS (2005) The Desmoteplase in Acute Ischemic Stroke Trial (DIAS): a phase II MRI-based 9-hour window acute stroke thrombolysis trial with intravenous desmoteplase. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 36:66-73.
- Hacke W, Donnan G, Fieschi C, Kaste M, von Kummer R, Broderick JP, Brott T, Frankel M, Grotta JC, Haley EC, Jr., Kwiatkowski T, Levine SR, Lewandowski C, Lu M, Lyden P, Marler JR, Patel S, Tilley BC, Albers G, Bluhmki E, Wilhelm M, Hamilton S, Investigators AT, Investigators ET, Investigators Nr-PSG (2004) Association of outcome with early stroke treatment: pooled analysis of ATLANTIS, ECASS, and NINDS rt-PA stroke trials. *Lancet* 363:768-774.

- Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Davalos A, Guidetti D, Larrue V, Lees KR, Medeghri Z, Machnig T, Schneider D, von Kummer R, Wahlgren N, Toni D, Investigators E (2008) Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. The New England journal of medicine 359:1317-1329.
- Hacke W, Kaste M, Fieschi C, Toni D, Lesaffre E, von Kummer R, Boysen G, Bluhmki E, Hoxter G, Mahagne MH, et al. (1995) Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS). JAMA : the journal of the American Medical Association 274:1017-1025.
- Hacke W, Kaste M, Fieschi C, von Kummer R, Davalos A, Meier D, Larrue V, Bluhmki E, Davis S, Donnan G, Schneider D, Diez-Tejedor E, Trouillas P (1998) Randomised double-blind placebo-controlled trial of thrombolytic therapy with intravenous alteplase in acute ischaemic stroke (ECASS II). Second European-Australasian Acute Stroke Study Investigators. Lancet 352:1245-1251.
- Haelewyn B, Risso JJ, Abraini JH (2010) Human recombinant tissue-plasminogen activator (alteplase): why not use the 'human' dose for stroke studies in rats? Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism 30:900-903.
- Hagino Y, Kasai S, Han W, Yamamoto H, Nabeshima T, Mishina M, Ikeda K (2010) Essential role of NMDA receptor channel epsilon4 subunit (GluN2D) in the effects of phencyclidine, but not methamphetamine. PloS one 5:e13722.
- Hajjar KA, Acharya SS (2000) Annexin II and regulation of cell surface fibrinolysis. Annals of the New York Academy of Sciences 902:265-271.
- Haley EC, Jr., Lyden PD, Johnston KC, Hemmen TM, Investigators TNKiS (2005) A pilot dose-escalation safety study of tenecteplase in acute ischemic stroke. Stroke; a journal of cerebral circulation 36:607-612.
- Hall J, Thomas KL, Everitt BJ (2000) Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning. Nature neuroscience 3:533-535.
- Hallett M (2007) Transcranial magnetic stimulation: a primer. Neuron 55:187-199.
- Hardingham GE, Bading H (2010) Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. Nature reviews Neuroscience 11:682-696.
- Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H (2002) Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. Nat Neurosci 5:405-414.
- Haring HP, Berg EL, Tsurushita N, Tagaya M, del Zoppo GJ (1996) E-selectin appears in nonischemic tissue during experimental focal cerebral ischemia. Stroke; a journal of cerebral circulation 27:1386-1391; discussion 1391-1382.
- Hariri AR, Goldberg TE, Mattay VS, Kolachana BS, Callicott JH, Egan MF, Weinberger DR (2003) Brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism affects human memory-related hippocampal activity and predicts memory performance. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 23:6690-6694.
- Harney SC, Jane DE, Anwyl R (2008) Extrasynaptic NR2D-containing NMDARs are recruited to the synapse during LTP of NMDAR-EPSCs. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 28:11685-11694.
- Henson MA, Roberts AC, Perez-Otano I, Philpot BD (2010) Influence of the NR3A subunit on NMDA receptor functions. Progress in neurobiology 91:23-37.
- Hermans-Borgmeyer I, Hermey G, Nykjaer A, Schaller C (1999) Expression of the 100-kDa neurotensin receptor sortilin during mouse embryonal development. Brain research Molecular brain research 65:216-219.
- Hertz L (2008) Bioenergetics of cerebral ischemia: a cellular perspective. Neuropharmacology 55:289-309.
- Herz J, Strickland DK (2001) LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. The Journal of clinical investigation 108:779-784.

- Hjort N, Wu O, Ashkanian M, Solling C, Mouridsen K, Christensen S, Gyldensted C, Andersen G, Ostergaard L (2008) MRI detection of early blood-brain barrier disruption: parenchymal enhancement predicts focal hemorrhagic transformation after thrombolysis. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 39:1025-1028.
- Hofer M, Pagliusi SR, Hohn A, Leibrock J, Barde YA (1990) Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *The EMBO journal* 9:2459-2464.
- Horii-Hayashi N, Yoshikawa M, Matsusue Y, Ishizaka S, Nishi M, Wanaka A (2011) Environmental stimulation changes tissue-type plasminogen activator activity in the adult mouse hippocampus. *Neurochemistry international* 58:1-4.
- Horn SD, DeJong G, Smout RJ, Gassaway J, James R, Conroy B (2005) Stroke rehabilitation patients, practice, and outcomes: is earlier and more aggressive therapy better? *Archives of physical medicine and rehabilitation* 86:S101-S114.
- Horstman LL, Jy W, Jimenez JJ, Ahn YS (2004) Endothelial microparticles as markers of endothelial dysfunction. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 9:1118-1135.
- Hoyte L, Barber PA, Buchan AM, Hill MD (2004) The rise and fall of NMDA antagonists for ischemic stroke. *Current molecular medicine* 4:131-136.
- Hrafnkelsdottir T, Erlinge D, Jern S (2001) Extracellular nucleotides ATP and UTP induce a marked acute release of tissue-type plasminogen activator in vivo in man. *Thrombosis and haemostasis* 85:875-881.
- Huang EJ, Reichardt LF (2003) Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annual review of biochemistry* 72:609-642.
- Huang PL, Fishman MC (1996) Genetic analysis of nitric oxide synthase isoforms: targeted mutation in mice. *Journal of molecular medicine* 74:415-421.
- Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC (1995) Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 377:239-242.
- Huang YY, Bach ME, Lipp HP, Zhuo M, Wolfer DP, Hawkins RD, Schoonjans L, Kandel ER, Godfraind JM, Mulligan R, Collen D, Carmeliet P (1996) Mice lacking the gene encoding tissue-type plasminogen activator show a selective interference with late-phase long-term potentiation in both Schaffer collateral and mossy fiber pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:8699-8704.
- Hurtado M, Lozano JJ, Castellanos E, Lopez-Fernandez LA, Harshman K, Martinez AC, Ortiz AR, Thomson TM, Paciucci R (2007) Activation of the epidermal growth factor signalling pathway by tissue plasminogen activator in pancreas cancer cells. *Gut* 56:1266-1274.
- Hyvarinen M, Qiao Q, Tuomilehto J, Laatikainen T, Heine RJ, Stehouwer CD, Alberti KG, Pyorala K, Zethelius B, Stegmayr B, Group DS (2009) Hyperglycemia and stroke mortality: comparison between fasting and 2-h glucose criteria. *Diabetes care* 32:348-354.
- Islam O, Loo TX, Heese K (2009) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) has proliferative effects on neural stem cells through the truncated TRK-B receptor, MAP kinase, AKT, and STAT-3 signaling pathways. *Current neurovascular research* 6:42-53.
- Jean YY, Lercher LD, Dreyfus CF (2008) Glutamate elicits release of BDNF from basal forebrain astrocytes in a process dependent on metabotropic receptors and the PLC pathway. *Neuron glia biology* 4:35-42.
- Jensen MB, Yoo B, Clarke WR, Davis PH, Adams HR, Jr. (2006) Blood pressure as an independent prognostic factor in acute ischemic stroke. *The Canadian journal of neurological sciences Le journal canadien des sciences neurologiques* 33:34-38.
- Jern C, Selin L, Jern S (1994) In vivo release of tissue-type plasminogen activator across the human forearm during mental stress. *Thrombosis and haemostasis* 72:285-291.
- Jern C, Selin L, Tengborn L, Jern S (1997) Sympathoadrenal activation and muscarinic receptor stimulation induce acute release of tissue-type plasminogen activator but not von Willebrand factor across the human forearm. *Thrombosis and haemostasis* 78:887-891.

- Jiang X, Wang Y, Hand AR, Gillies C, Cone RE, Kirk J, O'Rourke J (2002) Storage and release of tissue plasminogen activator by sympathetic axons in resistance vessel walls. *Microvascular research* 64:438-447.
- Jiang Y, Wei N, Lu T, Zhu J, Xu G, Liu X (2011) Intranasal brain-derived neurotrophic factor protects brain from ischemic insult via modulating local inflammation in rats. *Neuroscience* 172:398-405.
- Jimenez I, Sobrino T, Rodriguez-Yanez M, Pouso M, Cristobo I, Sabucedo M, Blanco M, Castellanos M, Leira R, Castillo J (2009) High serum levels of leptin are associated with post-stroke depression. *Psychological medicine* 39:1201-1209.
- Jin R, Yang G, Li G (2010) Molecular insights and therapeutic targets for blood-brain barrier disruption in ischemic stroke: critical role of matrix metalloproteinases and tissue-type plasminogen activator. *Neurobiology of disease* 38:376-385.
- Jorgensen HS, Nakayama H, Raaschou HO, Vive-Larsen J, Stoier M, Olsen TS (1995) Outcome and time course of recovery in stroke. Part I: Outcome. The Copenhagen Stroke Study. *Archives of physical medicine and rehabilitation* 76:399-405.
- Jullienne A, Montagne A, Orset C, Lesept F, Jane DE, Monaghan DT, Maubert E, Vivien D, Ali C (2011) Selective inhibition of GluN2D-containing N-methyl-D-aspartate receptors prevents tissue plasminogen activator-promoted neurotoxicity both in vitro and in vivo. *Molecular neurodegeneration* 6:68.
- Kaindl AM, Degos V, Peineau S, Gouadon E, Chhor V, Loron G, Le Charpentier T, Josserand J, Ali C, Vivien D, Collingridge GL, Lombet A, Issa L, Rene F, Loeffler JP, Kavelaars A, Verney C, Mantz J, Gressens P (2012) Activation of microglial N-methyl-D-aspartate receptors triggers inflammation and neuronal cell death in the developing and mature brain. *Annals of neurology* 72:536-549.
- Kallmunzer B, Krause C, Pauli E, Beck A, Breuer L, Kohrmann M, Kollmar R (2011) Standardized antipyretic treatment in stroke: a pilot study. *Cerebrovasc Dis* 31:382-389.
- Kalyan NK, Lee SG, Wilhelm J, Fu KP, Hum WT, Rappaport R, Hartzell RW, Urbano C, Hung PP (1988) Structure-function analysis with tissue-type plasminogen activator. Effect of deletion of NH2-terminal domains on its biochemical and biological properties. *The Journal of biological chemistry* 263:3971-3978.
- Kane RC, Bross PF, Farrell AT, Pazdur R (2003) Velcade: U.S. FDA approval for the treatment of multiple myeloma progressing on prior therapy. *The oncologist* 8:508-513.
- Kang HM, Choi KS, Kassam G, Fitzpatrick SL, Kwon M, Waisman DM (1999) Role of annexin II tetramer in plasminogen activation. *Trends in cardiovascular medicine* 9:92-102.
- Karege F, Schwald M, Cisse M (2002) Postnatal developmental profile of brain-derived neurotrophic factor in rat brain and platelets. *Neuroscience letters* 328:261-264.
- Kassner A, Roberts TP, Moran B, Silver FL, Mikulis DJ (2009) Recombinant tissue plasminogen activator increases blood-brain barrier disruption in acute ischemic stroke: an MR imaging permeability study. *AJNR American journal of neuroradiology* 30:1864-1869.
- Kastrup A, Groschel K, Ringer TM, Redecker C, Cordesmeyer R, Witte OW, Terborg C (2008) Early disruption of the blood-brain barrier after thrombolytic therapy predicts hemorrhage in patients with acute stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 39:2385-2387.
- Katsura K, Kristian T, Siesjo BK (1994) Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain. *Biochemical Society transactions* 22:991-996.
- Kaur J, Zhao Z, Klein GM, Lo EH, Buchan AM (2004) The neurotoxicity of tissue plasminogen activator? *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 24:945-963.
- Kawamoto Y, Nakamura S, Nakano S, Oka N, Akiguchi I, Kimura J (1996) Immunohistochemical localization of brain-derived neurotrophic factor in adult rat brain. *Neuroscience* 74:1209-1226.

- Kawamura K, Kawamura N, Fukuda J, Kumagai J, Hsueh AJ, Tanaka T (2007) Regulation of preimplantation embryo development by brain-derived neurotrophic factor. *Developmental biology* 311:147-158.
- Kawashita E, Kanno Y, Asayama H, Okada K, Ueshima S, Matsuo O, Matsuno H (2013) Involvement of alpha2-antiplasmin in dendritic growth of hippocampal neurons. *Journal of neurochemistry* 126:58-69.
- Ke Z, Yip SP, Li L, Zheng XX, Tong KY (2011) The effects of voluntary, involuntary, and forced exercises on brain-derived neurotrophic factor and motor function recovery: a rat brain ischemia model. *PloS one* 6:e16643.
- Keiner S, Witte OW, Redecker C (2009) Immunocytochemical detection of newly generated neurons in the perilesional area of cortical infarcts after intraventricular application of brain-derived neurotrophic factor. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 68:83-93.
- Kerschensteiner M, Gallmeier E, Behrens L, Leal VV, Misgeld T, Klinkert WE, Kolbeck R, Hoppe E, Oropeza-Wekerle RL, Bartke I, Stadelmann C, Lassmann H, Wekerle H, Hohlfeld R (1999) Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *The Journal of experimental medicine* 189:865-870.
- Kew JN, Richards JG, Mutel V, Kemp JA (1998) Developmental changes in NMDA receptor glycine affinity and ifenprodil sensitivity reveal three distinct populations of NMDA receptors in individual rat cortical neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18:1935-1943.
- Khedr EM, Ahmed MA, Fathy N, Rothwell JC (2005) Therapeutic trial of repetitive transcranial magnetic stimulation after acute ischemic stroke. *Neurology* 65:466-468.
- Khedr EM, Fetoh NA (2010) Short- and long-term effect of rTMS on motor function recovery after ischemic stroke. *Restorative neurology and neuroscience* 28:545-559.
- Kidwell CS, Latour L, Saver JL, Alger JR, Starkman S, Duckwiler G, Jahan R, Vinuela F, Kang DW, Warach S (2008) Thrombolytic toxicity: blood brain barrier disruption in human ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis* 25:338-343.
- Kim GS, Cho S, Nelson JW, Zipfel GJ, Han BH (2014) TrkB agonist antibody pretreatment enhances neuronal survival and long-term sensory motor function following hypoxic ischemic injury in neonatal rats. *PloS one* 9:e88962.
- Kim H, Li Q, Hempstead BL, Madri JA (2004) Paracrine and autocrine functions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) in brain-derived endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 279:33538-33546.
- Kim MW, Bang MS, Han TR, Ko YJ, Yoon BW, Kim JH, Kang LM, Lee KM, Kim MH (2005) Exercise increased BDNF and trkB in the contralateral hemisphere of the ischemic rat brain. *Brain research* 1052:16-21.
- Kim WS, Lim JY, Shin JH, Park HK, Tan SA, Park KU, Paik NJ (2013) Effect of the presence of brain-derived neurotrophic factor val(66)met polymorphism on the recovery in patients with acute subcortical stroke. *Annals of rehabilitation medicine* 37:311-319.
- Kintner DB, Anderson MK, Fitzpatrick JH, Jr., Sailor KA, Gilboe DD (2000) 31P-MRS-based determination of brain intracellular and interstitial pH: its application to in vivo H+ compartmentation and cellular regulation during hypoxic/ischemic conditions. *Neurochemical research* 25:1385-1396.
- Kiprianova I, Sandkuhler J, Schwab S, Hoyer S, Spranger M (1999) Brain-derived neurotrophic factor improves long-term potentiation and cognitive functions after transient forebrain ischemia in the rat. *Experimental neurology* 159:511-519.
- Klatzo I (1985) Brain oedema following brain ischaemia and the influence of therapy. *British journal of anaesthesia* 57:18-22.
- Klocking HP, Astedt B, Gerlach D (1984) Characterisation of the vascular plasminogen activator from the pig ear. *Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch* 111:851-861.

- Kobayashi Y (2006) Neutrophil infiltration and chemokines. *Critical reviews in immunology* 26:307-316.
- Koistinaho M, Malm TM, Kettunen MI, Goldsteins G, Starckx S, Kauppinen RA, Opdenakker G, Koistinaho J (2005) Minocycline protects against permanent cerebral ischemia in wild type but not in matrix metalloprotease-9-deficient mice. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 25:460-467.
- Kokaia Z, Nawa H, Uchino H, Elmer E, Kokaia M, Carnahan J, Smith ML, Siesjo BK, Lindvall O (1996) Regional brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein levels following transient forebrain ischemia in the rat. *Brain research Molecular brain research* 38:139-144.
- Kokaia Z, Zhao Q, Kokaia M, Elmer E, Metsis M, Smith ML, Siesjo BK, Lindvall O (1995) Regulation of brain-derived neurotrophic factor gene expression after transient middle cerebral artery occlusion with and without brain damage. *Experimental neurology* 136:73-88.
- Kono S, Deguchi K, Morimoto N, Kurata T, Yamashita T, Ikeda Y, Narai H, Manabe Y, Takao Y, Kawada S, Kashiwara K, Takehisa Y, Inoue S, Kiriya H, Abe K (2013) Intravenous thrombolysis with neuroprotective therapy by edaravone for ischemic stroke patients older than 80 years of age. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association* 22:1175-1183.
- Kotermanski SE, Johnson JW (2009) Mg²⁺ imparts NMDA receptor subtype selectivity to the Alzheimer's drug memantine. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:2774-2779.
- Kozisek ME, Middlemas D, Bylund DB (2008) The differential regulation of BDNF and TrkB levels in juvenile rats after four days of escitalopram and desipramine treatment. *Neuropharmacology* 54:251-257.
- Krabbe KS, Nielsen AR, Krogh-Madsen R, Plomgaard P, Rasmussen P, Erikstrup C, Fischer CP, Lindegaard B, Petersen AM, Taudorf S, Secher NH, Pilegaard H, Bruunsgaard H, Pedersen BK (2007) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and type 2 diabetes. *Diabetologia* 50:431-438.
- Kratzschmar J, Haendler B, Langer G, Boidol W, Bringmann P, Alagon A, Donner P, Schleuning WD (1991) The plasminogen activator family from the salivary gland of the vampire bat *Desmodus rotundus*: cloning and expression. *Gene* 105:229-237.
- Kristian T (2004) Metabolic stages, mitochondria and calcium in hypoxic/ischemic brain damage. *Cell calcium* 36:221-233.
- Krizsan-Agbas D, Pedchenko T, Hasan W, Smith PG (2003) Oestrogen regulates sympathetic neurite outgrowth by modulating brain derived neurotrophic factor synthesis and release by the rodent uterus. *The European journal of neuroscience* 18:2760-2768.
- Krueger SR, Ghisu GP, Cinelli P, Gschwend TP, Osterwalder T, Wolfer DP, Sonderegger P (1997) Expression of neuroserpin, an inhibitor of tissue plasminogen activator, in the developing and adult nervous system of the mouse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17:8984-8996.
- Krystosek A, Seeds NW (1981) Plasminogen activator release at the neuronal growth cone. *Science* 213:1532-1534.
- Kugler C, Altenhoner T, Lochner P, Ferbert A, Hessian Stroke Data Bank Study Group ASH (2003) Does age influence early recovery from ischemic stroke? A study from the Hessian Stroke Data Bank. *Journal of neurology* 250:676-681.
- Kuiper J, Van't Hof A, Otter M, Biessen EA, Rijken DC, van Berkel TJ (1996) Interaction of mutants of tissue-type plasminogen activator with liver cells: effect of domain deletions. *The Biochemical journal* 313 (Pt 3):775-780.
- Kuppers E, Beyer C (2001) Dopamine regulates brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in cultured embryonic mouse striatal cells. *Neuroreport* 12:1175-1179.
- Lai AY, Todd KG (2008) Differential regulation of trophic and proinflammatory microglial effectors is dependent on severity of neuronal injury. *Glia* 56:259-270.

- Lampl Y, Boaz M, Gilad R, Lorberboym M, Dabby R, Rapoport A, Anca-Hershkowitz M, Sadeh M (2007) Minocycline treatment in acute stroke: an open-label, evaluator-blinded study. *Neurology* 69:1404-1410.
- Lansberg MG, Albers GW, Wijman CA (2007) Symptomatic intracerebral hemorrhage following thrombolytic therapy for acute ischemic stroke: a review of the risk factors. *Cerebrovasc Dis* 24:1-10.
- Lapchak PA (2006) Memantine, an uncompetitive low affinity NMDA open-channel antagonist improves clinical rating scores in a multiple infarct embolic stroke model in rabbits. *Brain research* 1088:141-147.
- Larsen GR, Metzger M, Henson K, Blue Y, Horgan P (1989) Pharmacokinetic and distribution analysis of variant forms of tissue-type plasminogen activator with prolonged clearance in rat. *Blood* 73:1842-1850.
- Latour LL, Kang DW, Ezzeddine MA, Chalela JA, Warach S (2004) Early blood-brain barrier disruption in human focal brain ischemia. *Annals of neurology* 56:468-477.
- Lau CG, Zukin RS (2007) NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nature reviews Neuroscience* 8:413-426.
- Laurenzi MA, Barbany G, Timmusk T, Lindgren JA, Persson H (1994) Expression of mRNA encoding neurotrophins and neurotrophin receptors in rat thymus, spleen tissue and immunocompetent cells. Regulation of neurotrophin-4 mRNA expression by mitogens and leukotriene B4. *European journal of biochemistry / FEBS* 223:733-741.
- Lebrazi JS, M.M. ; Bachmann, F. (2003) Système du Plasminogène et son exploration. *Encyclopédie Médico-chirurgicale* 13-019-A-30:18.
- Lee CH, Park JH, Yoo KY, Choi JH, Hwang IK, Ryu PD, Kim DH, Kwon YG, Kim YM, Won MH (2011) Pre- and post-treatments with escitalopram protect against experimental ischemic neuronal damage via regulation of BDNF expression and oxidative stress. *Experimental neurology* 229:450-459.
- Lee CZ, Xue Z, Zhu Y, Yang GY, Young WL (2007a) Matrix metalloproteinase-9 inhibition attenuates vascular endothelial growth factor-induced intracerebral hemorrhage. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 38:2563-2568.
- Lee HY, Hwang IY, Im H, Koh JY, Kim YH (2007b) Non-proteolytic neurotrophic effects of tissue plasminogen activator on cultured mouse cerebrocortical neurons. *Journal of neurochemistry* 101:1236-1247.
- Lee JY, Lee HE, Kang SR, Choi HY, Ryu JH, Yune TY (2013a) Fluoxetine inhibits transient global ischemia-induced hippocampal neuronal death and memory impairment by preventing blood-brain barrier disruption. *Neuropharmacology* 79C:161-171.
- Lee JY, Lee HE, Kang SR, Choi HY, Ryu JH, Yune TY (2014) Fluoxetine inhibits transient global ischemia-induced hippocampal neuronal death and memory impairment by preventing blood-brain barrier disruption. *Neuropharmacology* 79:161-171.
- Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL (2001) Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294:1945-1948.
- Lee SR, Guo SZ, Scannevin RH, Magliaro BC, Rhodes KJ, Wang X, Lo EH (2007c) Induction of matrix metalloproteinase, cytokines and chemokines in rat cortical astrocytes exposed to plasminogen activators. *Neurosci Lett* 417:1-5.
- Lee Y, Lim SW, Kim SY, Chung JW, Kim J, Myung W, Song J, Kim S, Carroll BJ, Kim DK (2013b) Association between the BDNF Val66Met Polymorphism and Chronicity of Depression. *Psychiatry investigation* 10:56-61.
- Lemarchant S, Docagne F, Emery E, Vivien D, Ali C, Rubio M (2012) tPA in the injured central nervous system: different scenarios starring the same actor? *Neuropharmacology* 62:749-756.
- Lemarchant S, Pruvost M, Hebert M, Gauberti M, Hommet Y, Briens A, Maubert E, Gueye Y, Feron F, Petite D, Mersel M, do Rego JC, Vaudry H, Koistinaho J, Ali C, Agin V, Emery E, Vivien D (2014) tPA promotes ADAMTS-4-induced CSPG degradation, thereby enhancing neuroplasticity following spinal cord injury. *Neurobiology of disease* 66C:28-42.

- Lenzi GL, Altieri M, Maestrini I (2008) Post-stroke depression. *Revue neurologique* 164:837-840.
- Lessmann V, Brigadski T (2009) Mechanisms, locations, and kinetics of synaptic BDNF secretion: an update. *Neuroscience research* 65:11-22.
- Lessmann V, Gottmann K, Malcangio M (2003) Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Progress in neurobiology* 69:341-374.
- Levin EG, Loskutoff DJ (1982) Regulation of plasminogen activator production by cultured endothelial cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 401:184-194.
- Levivier M, Przedborski S, Bencsics C, Kang UJ (1995) Intrastriatal implantation of fibroblasts genetically engineered to produce brain-derived neurotrophic factor prevents degeneration of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15:7810-7820.
- Li Y, Liu Z, Xin H, Chopp M (2014) The role of astrocytes in mediating exogenous cell-based restorative therapy for stroke. *Glia* 62:1-16.
- Liepert J (2008) Pharmacotherapy in restorative neurology. *Current opinion in neurology* 21:639-643.
- Lindfors N, Ernfors P, Falkenberg T, Persson H (1992) Septal cholinergic afferents regulate expression of brain-derived neurotrophic factor and beta-nerve growth factor mRNA in rat hippocampus. *Experimental brain research Experimentelle Hirnforschung Experimentation cerebrale* 88:78-90.
- Lindholm D, Dechant G, Heisenberg CP, Thoenen H (1993) Brain-derived neurotrophic factor is a survival factor for cultured rat cerebellar granule neurons and protects them against glutamate-induced neurotoxicity. *The European journal of neuroscience* 5:1455-1464.
- Ling C, Zou T, Hsiao Y, Tao X, Chen ZL, Strickland S, Song H (2006) Disruption of tissue plasminogen activator gene reduces macrophage migration. *Biochemical and biophysical research communications* 349:906-912.
- Liot G, Roussel BD, Lebeurrier N, Benchenane K, Lopez-Atalaya JP, Vivien D, Ali C (2006) Tissue-type plasminogen activator rescues neurones from serum deprivation-induced apoptosis through a mechanism independent of its proteolytic activity. *Journal of neurochemistry* 98:1458-1464.
- Lipton P (1999) Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 79:1431-1568.
- Liu D, Cheng T, Guo H, Fernandez JA, Griffin JH, Song X, Zlokovic BV (2004a) Tissue plasminogen activator neurovascular toxicity is controlled by activated protein C. *Nature medicine* 10:1379-1383.
- Liu XB, Murray KD, Jones EG (2004b) Switching of NMDA receptor 2A and 2B subunits at thalamic and cortical synapses during early postnatal development. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24:8885-8895.
- Lloyd-Jones D, Adams R, Carnethon M, De Simone G, Ferguson TB, Flegal K, Ford E, Furie K, Go A, Greenland K, Haase N, Hailpern S, Ho M, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lackland D, Lisabeth L, Marelli A, McDermott M, Meigs J, Mozaffarian D, Nichol G, O'Donnell C, Roger V, Rosamond W, Sacco R, Sorlie P, Stafford R, Steinberger J, Thom T, Wasserthiel-Smoller S, Wong N, Wylie-Rosett J, Hong Y, American Heart Association Statistics C, Stroke Statistics S (2009) Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 119:e21-181.
- Lochner JE, Honigman LS, Grant WF, Gessford SK, Hansen AB, Silverman MA, Scalettar BA (2006) Activity-dependent release of tissue plasminogen activator from the dendritic spines of hippocampal neurons revealed by live-cell imaging. *Journal of neurobiology* 66:564-577.
- Lommatzsch M, Zingler D, Schuhbaeck K, Schloetcke K, Zingler C, Schuff-Werner P, Virchow JC (2005) The impact of age, weight and gender on BDNF levels in human platelets and plasma. *Neurobiology of aging* 26:115-123.
- Lopez-Atalaya JP, Roussel BD, Levrat D, Parcq J, Nicole O, Hommet Y, Benchenane K, Castel H, Leprince J, To Van D, Bureau R, Rault S, Vaudry H, Petersen KU, Santos JS, Ali C, Vivien D (2008) Toward safer thrombolytic agents in stroke: molecular requirements for NMDA

- receptor-mediated neurotoxicity. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 28:1212-1221.
- Lopez-Neblina F, Toledo AH, Toledo-Pereyra LH (2005) Molecular biology of apoptosis in ischemia and reperfusion. *Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research* 18:335-350.
- Lorenz M, Wilck N, Meiners S, Ludwig A, Baumann G, Stangl K, Stangl V (2009) Proteasome inhibition prevents experimentally-induced endothelial dysfunction. *Life sciences* 84:929-934.
- Lorgis L, Amoureux S, de Maistre E, Sicard P, Bejot Y, Zeller M, Vergely C, Sequeira-Le Grand A, Lagrost AC, Berchoud J, Cottin Y, Rochette L (2010) Serum brain-derived neurotrophic factor and platelet activation evaluated by soluble P-selectin and soluble CD-40-ligand in patients with acute myocardial infarction. *Fundamental & clinical pharmacology* 24:525-530.
- Loscalzo J (1988) Structural and kinetic comparison of recombinant human single- and two-chain tissue plasminogen activator. *The Journal of clinical investigation* 82:1391-1397.
- Loskutoff DJ, van Mourik JA, Erickson LA, Lawrence D (1983) Detection of an unusually stable fibrinolytic inhibitor produced by bovine endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80:2956-2960.
- Lu B, Nagappan G, Lu Y (2014) BDNF and synaptic plasticity, cognitive function, and dysfunction. *Handbook of experimental pharmacology* 220:223-250.
- Lu B, Pang PT, Woo NH (2005) The yin and yang of neurotrophin action. *Nature reviews Neuroscience* 6:603-614.
- Lu Y, Christian K, Lu B (2008) BDNF: a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory? *Neurobiology of learning and memory* 89:312-323.
- Luberg K, Wong J, Weickert CS, Timmusk T (2010) Human TrkB gene: novel alternative transcripts, protein isoforms and expression pattern in the prefrontal cerebral cortex during postnatal development. *Journal of neurochemistry* 113:952-964.
- Luk JK, Cheung RT, Ho SL, Li L (2006) Does age predict outcome in stroke rehabilitation? A study of 878 Chinese subjects. *Cerebrovasc Dis* 21:229-234.
- Luo M, Hajjar KA (2013) Annexin A2 system in human biology: cell surface and beyond. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 39:338-346.
- Lyden P (2011) Tenecteplase for acute ischemic stroke. *International journal of stroke : official journal of the International Stroke Society* 6:509-510.
- Machado LS, Kozak A, Ergul A, Hess DC, Borlongan CV, Fagan SC (2006) Delayed minocycline inhibits ischemia-activated matrix metalloproteinases 2 and 9 after experimental stroke. *BMC neuroscience* 7:56.
- Macrez R, Bezin L, Le Mauff B, Ali C, Vivien D (2010) Functional occurrence of the interaction of tissue plasminogen activator with the NR1 Subunit of N-methyl-D-aspartate receptors during stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 41:2950-2955.
- Macrez R, Obiang P, Gauberti M, Roussel B, Baron A, Parcq J, Casse F, Hommet Y, Orset C, Agin V, Bezin L, Berrocoso TG, Petersen KU, Montaner J, Maubert E, Vivien D, Ali C (2011) Antibodies preventing the interaction of tissue-type plasminogen activator with N-methyl-D-aspartate receptors reduce stroke damages and extend the therapeutic window of thrombolysis. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 42:2315-2322.
- Madinier A, Bertrand N, Mossiat C, Prigent-Tessier A, Beley A, Marie C, Garnier P (2009) Microglial involvement in neuroplastic changes following focal brain ischemia in rats. *PloS one* 4:e8101.
- Madinier A, Bertrand N, Rodier M, Quirie A, Mossiat C, Prigent-Tessier A, Marie C, Garnier P (2013) Ipsilateral versus contralateral spontaneous post-stroke neuroplastic changes: involvement of BDNF? *Neuroscience* 231:169-181.
- Mahagne MH (2007) [Acute management and secondary prevention of ischemic stroke]. *Presse medicale* 36:128-133.
- Mannari C, Origlia N, Scatena A, Del Debbio A, Catena M, Dell'agnello G, Barraco A, Giovannini L, Dell'osso L, Domenici L, Piccinni A (2008) BDNF level in the rat prefrontal cortex increases

- following chronic but not acute treatment with duloxetine, a dual acting inhibitor of noradrenaline and serotonin re-uptake. *Cellular and molecular neurobiology* 28:457-468.
- Manni L, Nikolova V, Vyagova D, Chaldakov GN, Aloe L (2005) Reduced plasma levels of NGF and BDNF in patients with acute coronary syndromes. *International journal of cardiology* 102:169-171.
- Mansur CG, Fregni F, Boggio PS, Riberto M, Gallucci-Neto J, Santos CM, Wagner T, Rigonatti SP, Marcolin MA, Pascual-Leone A (2005) A sham stimulation-controlled trial of rTMS of the unaffected hemisphere in stroke patients. *Neurology* 64:1802-1804.
- Marie C, Bralet J (1991) Blood glucose level and morphological brain damage following cerebral ischemia. *Cerebrovascular and brain metabolism reviews* 3:29-38.
- Martin AM, Kuhlmann C, Trossbach S, Jaeger S, Waldron E, Roebroek A, Luhmann HJ, Laatsch A, Weggen S, Lessmann V, Pietrzik CU (2008) The functional role of the second NPXY motif of the LRP1 beta-chain in tissue-type plasminogen activator-mediated activation of N-methyl-D-aspartate receptors. *The Journal of biological chemistry* 283:12004-12013.
- Martinsson L, Hardemark H, Eksborg S (2007) Amphetamines for improving recovery after stroke. *The Cochrane database of systematic reviews* CD002090.
- Matsumoto T, Rauskolb S, Polack M, Klose J, Kolbeck R, Korte M, Barde YA (2008) Biosynthesis and processing of endogenous BDNF: CNS neurons store and secrete BDNF, not pro-BDNF. *Nature neuroscience* 11:131-133.
- Matthews VB, Astrom MB, Chan MH, Bruce CR, Krabbe KS, Prelovsek O, Akerstrom T, Yfanti C, Broholm C, Mortensen OH, Penkowa M, Hojman P, Zankari A, Watt MJ, Bruunsgaard H, Pedersen BK, Febbraio MA (2009) Brain-derived neurotrophic factor is produced by skeletal muscle cells in response to contraction and enhances fat oxidation via activation of AMP-activated protein kinase. *Diabetologia* 52:1409-1418.
- Mattson MP (2008) Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1144:97-112.
- McCarthy DM, Brown AN, Bhide PG (2012) Regulation of BDNF expression by cocaine. *The Yale journal of biology and medicine* 85:437-446.
- Medcalf RL, Davis SM (2012) Plasminogen activation and thrombolysis for ischemic stroke. *International journal of stroke : official journal of the International Stroke Society* 7:419-425.
- Medcalf RL, Stasinopoulos SJ (2005) The undecided serpin. The ins and outs of plasminogen activator inhibitor type 2. *The FEBS journal* 272:4858-4867.
- Medina MG, Ledesma MD, Dominguez JE, Medina M, Zafra D, Alameda F, Dotti CG, Navarro P (2005) Tissue plasminogen activator mediates amyloid-induced neurotoxicity via Erk1/2 activation. *The EMBO journal* 24:1706-1716.
- Mehta SL, Manhas N, Raghubir R (2007) Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain research reviews* 54:34-66.
- Mellstrom B, Torres B, Link WA, Naranjo JR (2004) The BDNF gene: exemplifying complexity in Ca²⁺ - dependent gene expression. *Critical reviews in neurobiology* 16:43-49.
- Mergenthaler P, Dirnagl U, Meisel A (2004) Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. *Metabolic brain disease* 19:151-167.
- Metallo CM, Vodyanik MA, de Pablo JJ, Slukvin, II, Palecek SP (2008) The response of human embryonic stem cell-derived endothelial cells to shear stress. *Biotechnology and bioengineering* 100:830-837.
- Metsis M, Timmusk T, Arenas E, Persson H (1993) Differential usage of multiple brain-derived neurotrophic factor promoters in the rat brain following neuronal activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:8802-8806.
- Miklic S, Juric DM, Carman-Krzan M (2004) Differences in the regulation of BDNF and NGF synthesis in cultured neonatal rat astrocytes. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 22:119-130.
- Millerot-Serruot E, Chausset A, Mossiat C, Prigent-Tessier A, Bertrand N, Garnier P, Beley A, Marie C (2007) Effect of early decrease in the lesion size on late brain tissue loss, synaptophysin

- expression and functionality after a focal brain lesion in rats. *Neurochemistry international* 50:328-335.
- Miranda E, Lomas DA (2006) Neuroserpin: a serpin to think about. *Cellular and molecular life sciences* : CMLS 63:709-722.
- Miyamoto Y, Yamada K, Noda Y, Mori H, Mishina M, Nabeshima T (2002) Lower sensitivity to stress and altered monoaminergic neuronal function in mice lacking the NMDA receptor epsilon 4 subunit. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22:2335-2342.
- Mogi M, Togari A, Kondo T, Mizuno Y, Komure O, Kuno S, Ichinose H, Nagatsu T (1999) Brain-derived growth factor and nerve growth factor concentrations are decreased in the substantia nigra in Parkinson's disease. *Neuroscience letters* 270:45-48.
- Mohammadi MT, Shid-Moosavi SM, Dehghani GA (2012) Contribution of nitric oxide synthase (NOS) in blood-brain barrier disruption during acute focal cerebral ischemia in normal rat. *Pathophysiology : the official journal of the International Society for Pathophysiology / ISP* 19:13-20.
- Montagne A, Hebert M, Jullienne A, Lesept F, Le Behot A, Louessard M, Gauberti M, Orset C, Ali C, Agin V, Maubert E, Vivien D (2012) Memantine improves safety of thrombolysis for stroke. *Stroke* 43:2774-2781.
- Mony L, Kew JN, Gunthorpe MJ, Paoletti P (2009) Allosteric modulators of NR2B-containing NMDA receptors: molecular mechanisms and therapeutic potential. *British journal of pharmacology* 157:1301-1317.
- Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12:529-540.
- Moonen G, Grau-Wagemans MP, Selak I (1982) Plasminogen activator-plasmin system and neuronal migration. *Nature* 298:753-755.
- Mooradian AD, Haas MJ, Batejko O, Hovsepyan M, Feman SS (2005) Statins ameliorate endothelial barrier permeability changes in the cerebral tissue of streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 54:2977-2982.
- Mowla SJ, Farhadi HF, Pareek S, Atwal JK, Morris SJ, Seidah NG, Murphy RA (2001) Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *The Journal of biological chemistry* 276:12660-12666.
- Muir KW (2006) Glutamate-based therapeutic approaches: clinical trials with NMDA antagonists. *Current opinion in pharmacology* 6:53-60.
- Muller HD, Hanumanthiah KM, Diederich K, Schwab S, Schabitz WR, Sommer C (2008) Brain-derived neurotrophic factor but not forced arm use improves long-term outcome after photothrombotic stroke and transiently upregulates binding densities of excitatory glutamate receptors in the rat brain. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 39:1012-1021.
- Munkholm K, Pedersen BK, Kessing LV, Vinberg M (2014) Elevated levels of plasma brain derived neurotrophic factor in rapid cycling bipolar disorder patients. *Psychoneuroendocrinology* 47:199-211.
- Muoio V, Persson PB, Sendeski MM (2014) The neurovascular unit - concept review. *Acta physiologica* 210:790-798.
- Murata Y, Rosell A, Scannevin RH, Rhodes KJ, Wang X, Lo EH (2008) Extension of the thrombolytic time window with minocycline in experimental stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 39:3372-3377.
- Murphy TH, Corbett D (2009) Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour. *Nature reviews Neuroscience* 10:861-872.
- Nagappan G, Zaitsev E, Senatorov VV, Jr., Yang J, Hempstead BL, Lu B (2009) Control of extracellular cleavage of ProBDNF by high frequency neuronal activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:1267-1272.

- Nakahashi T, Fujimura H, Altar CA, Li J, Kambayashi J, Tandon NN, Sun B (2000) Vascular endothelial cells synthesize and secrete brain-derived neurotrophic factor. *FEBS letters* 470:113-117.
- Nakazato M, Hashimoto K, Shimizu E, Niitsu T, Iyo M (2012) Possible involvement of brain-derived neurotrophic factor in eating disorders. *IUBMB life* 64:355-361.
- Nakazawa T, Komai S, Tezuka T, Hisatsune C, Umemori H, Semba K, Mishina M, Manabe T, Yamamoto T (2001) Characterization of Fyn-mediated tyrosine phosphorylation sites on GluR epsilon 2 (NR2B) subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. *The Journal of biological chemistry* 276:693-699.
- Narantuya D, Nagai A, Sheikh AM, Masuda J, Kobayashi S, Yamaguchi S, Kim SU (2010) Human microglia transplanted in rat focal ischemia brain induce neuroprotection and behavioral improvement. *PloS one* 5:e11746.
- Nemoto K, Fukamachi K, Nemoto F, Miyata S, Hamada M, Nakamura Y, Senba E, Ueyama T (1998) Gene expression of neurotrophins and their receptors in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Biochemical and biophysical research communications* 245:284-288.
- Neuhoff H, Roeper J, Schweizer M (1999) Activity-dependent formation of perforated synapses in cultured hippocampal neurons. *The European journal of neuroscience* 11:4241-4250.
- Newby DE, Wright RA, Dawson P, Ludlam CA, Boon NA, Fox KA, Webb DJ (1998) The L-arginine/nitric oxide pathway contributes to the acute release of tissue plasminogen activator in vivo in man. *Cardiovascular research* 38:485-492.
- Ng KS, Leung HW, Wong PT, Low CM (2012) Cleavage of the NR2B subunit amino terminus of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor by tissue plasminogen activator: identification of the cleavage site and characterization of ifenprodil and glycine affinities on truncated NMDA receptor. *The Journal of biological chemistry* 287:25520-25529.
- Nicole O, Docagne F, Ali C, Margail I, Carmeliet P, MacKenzie ET, Vivien D, Buisson A (2001) The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nature medicine* 7:59-64.
- Nogawa S, Zhang F, Ross ME, Iadecola C (1997) Cyclo-oxygenase-2 gene expression in neurons contributes to ischemic brain damage. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17:2746-2755.
- Nuutinen J, Liu Y, Laakso MP, Karonen JO, Roivainen R, Vanninen RL, Partanen K, Ostergaard L, Sivenius J, Aronen HJ (2006) Assessing the outcome of stroke: a comparison between MRI and clinical stroke scales. *Acta neurologica Scandinavica* 113:100-107.
- Nygren J, Kokaia M, Wieloch T (2006) Decreased expression of brain-derived neurotrophic factor in BDNF(+/-) mice is associated with enhanced recovery of motor performance and increased neuroblast number following experimental stroke. *Journal of neuroscience research* 84:626-631.
- O'Connor TM, O'Connell J, O'Brien DI, Goode T, Bredin CP, Shanahan F (2004) The role of substance P in inflammatory disease. *Journal of cellular physiology* 201:167-180.
- Obiang P, Macrez R, Jullienne A, Bertrand T, Lesept F, Ali C, Maubert E, Vivien D, Agin V (2012) GluN2D subunit-containing NMDA receptors control tissue plasminogen activator-mediated spatial memory. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32:12726-12734.
- Obiang P, Maubert E, Bardou I, Nicole O, Launay S, Bezin L, Vivien D, Agin V (2011) Enriched housing reverses age-associated impairment of cognitive functions and tPA-dependent maturation of BDNF. *Neurobiology of learning and memory* 96:121-129.
- Ochs G, Penn RD, York M, Giess R, Beck M, Tonn J, Haigh J, Malta E, Traub M, Sendtner M, Toyka KV (2000) A phase I/II trial of recombinant methionyl human brain derived neurotrophic factor administered by intrathecal infusion to patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron disorders : official publication of the World Federation of Neurology, Research Group on Motor Neuron Diseases* 1:201-206.

- Ohira K, Shimizu K, Hayashi M (1999) Change of expression of full-length and truncated TrkB_s in the developing monkey central nervous system. *Brain research Developmental brain research* 112:21-29.
- Okada S, Yokoyama M, Toko H, Tateno K, Moriya J, Shimizu I, Nojima A, Ito T, Yoshida Y, Kobayashi Y, Katagiri H, Minamino T, Komuro I (2012) Brain-derived neurotrophic factor protects against cardiac dysfunction after myocardial infarction via a central nervous system-mediated pathway. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 32:1902-1909.
- Okada Y, Copeland BR, Mori E, Tung MM, Thomas WS, del Zoppo GJ (1994) P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 expression after focal brain ischemia and reperfusion. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 25:202-211.
- Oliver JJ, Webb DJ, Newby DE (2005) Stimulated tissue plasminogen activator release as a marker of endothelial function in humans. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25:2470-2479.
- Orth K, Willnow T, Herz J, Gething MJ, Sambrook J (1994) Low density lipoprotein receptor-related protein is necessary for the internalization of both tissue-type plasminogen activator-inhibitor complexes and free tissue-type plasminogen activator. *The Journal of biological chemistry* 269:21117-21122.
- Ortiz-Zapater E, Peiro S, Roda O, Corominas JM, Aguilar S, Ampurdanes C, Real FX, Navarro P (2007) Tissue plasminogen activator induces pancreatic cancer cell proliferation by a non-catalytic mechanism that requires extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation through epidermal growth factor receptor and annexin A2. *The American journal of pathology* 170:1573-1584.
- Ortolano S, Spuch C (2013) tPA in the central nervous system: relations between tPA and cell surface LRP_s. *Recent patents on endocrine, metabolic & immune drug discovery* 7:65-76.
- Ottenbacher KJ, Jannell S (1993) The results of clinical trials in stroke rehabilitation research. *Archives of neurology* 50:37-44.
- Otter M, Barrett-Bergshoeff MM, Rijken DC (1991) Binding of tissue-type plasminogen activator by the mannose receptor. *The Journal of biological chemistry* 266:13931-13935.
- Ozcelik T, Rosenthal A, Francke U (1991) Chromosomal mapping of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 genes in man and mouse. *Genomics* 10:569-575.
- Pachernegg S, Strutz-Seeböhm N, Hollmann M (2012) GluN3 subunit-containing NMDA receptors: not just one-trick ponies. *Trends in neurosciences* 35:240-249.
- Pan W, Banks WA, Fasold MB, Bluth J, Kastin AJ (1998) Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier. *Neuropharmacology* 37:1553-1561.
- Pan W, Kastin AJ, Zankel TC, van Kerkhof P, Terasaki T, Bu G (2004) Efficient transfer of receptor-associated protein (RAP) across the blood-brain barrier. *Journal of cell science* 117:5071-5078.
- Pang PT, Teng HK, Zaitsev E, Woo NT, Sakata K, Zhen S, Teng KK, Yung WH, Hempstead BL, Lu B (2004) Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science* 306:487-491.
- Paoletti P (2011) Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *The European journal of neuroscience* 33:1351-1365.
- Paoletti P, Bellone C, Zhou Q (2013) NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature reviews Neuroscience* 14:383-400.
- Paolucci S, Antonucci G, Grasso MG, Morelli D, Troisi E, Coiro P, Bragioni M (2000) Early versus delayed inpatient stroke rehabilitation: a matched comparison conducted in Italy. *Archives of physical medicine and rehabilitation* 81:695-700.
- Papadopoulos CM, Tsai SY, Guillen V, Ortega J, Kartje GL, Wolf WA (2009) Motor recovery and axonal plasticity with short-term amphetamine after stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 40:294-302.
- Papi A, Contoli M, Gasparini P, Bristot L, Edwards MR, Chicca M, Leis M, Ciaccia A, Caramori G, Johnston SL, Pinamonti S (2008) Role of xanthine oxidase activation and reduced glutathione

- depletion in rhinovirus induction of inflammation in respiratory epithelial cells. *The Journal of biological chemistry* 283:28595-28606.
- Parcq J, Bertrand T, Montagne A, Baron AF, Macrez R, Billard JM, Briens A, Hommet Y, Wu J, Yepes M, Lijnen HR, Dutar P, Angles-Cano E, Vivien D (2012) Unveiling an exceptional zymogen: the single-chain form of tPA is a selective activator of NMDA receptor-dependent signaling and neurotoxicity. *Cell death and differentiation* 19:1983-1991.
- Pardridge WM, Kang YS, Buciak JL (1994) Transport of human recombinant brain-derived neurotrophic factor (BDNF) through the rat blood-brain barrier in vivo using vector-mediated peptide drug delivery. *Pharmaceutical research* 11:738-746.
- Pariante J, Loubinoux I, Carel C, Albucher JF, Leger A, Manelfe C, Rascol O, Chollet F (2001) Fluoxetine modulates motor performance and cerebral activation of patients recovering from stroke. *Annals of neurology* 50:718-729.
- Parmentier-Batteur S, Bohme GA, Lerouet D, Zhou-Ding L, Beray V, Margail I, Plotkine M (2001) Antisense oligodeoxynucleotide to inducible nitric oxide synthase protects against transient focal cerebral ischemia-induced brain injury. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 21:15-21.
- Parsons M, Spratt N, Bivard A, Campbell B, Chung K, Miteff F, O'Brien B, Bladin C, McElduff P, Allen C, Bateman G, Donnan G, Davis S, Levi C (2012) A randomized trial of tenecteplase versus alteplase for acute ischemic stroke. *The New England journal of medicine* 366:1099-1107.
- Parsons MW, Miteff F, Bateman GA, Spratt N, Loiselle A, Attia J, Levi CR (2009) Acute ischemic stroke: imaging-guided tenecteplase treatment in an extended time window. *Neurology* 72:915-921.
- Patel AT, Duncan PW, Lai SM, Studenski S (2000) The relation between impairments and functional outcomes poststroke. *Archives of physical medicine and rehabilitation* 81:1357-1363.
- Patterson SL, Abel T, Deuel TA, Martin KC, Rose JC, Kandel ER (1996) Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. *Neuron* 16:1137-1145.
- Pawlak R, Melchor JP, Matys T, Skrzypiec AE, Strickland S (2005) Ethanol-withdrawal seizures are controlled by tissue plasminogen activator via modulation of NR2B-containing NMDA receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:443-448.
- Pencea V, Bingaman KD, Wiegand SJ, Luskin MB (2001) Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21:6706-6717.
- Pendlebury ST, Rothwell PM (2009) Prevalence, incidence, and factors associated with pre-stroke and post-stroke dementia: a systematic review and meta-analysis. *Lancet neurology* 8:1006-1018.
- Peng S, Wu J, Mufson EJ, Fahnstock M (2005) Precursor form of brain-derived neurotrophic factor and mature brain-derived neurotrophic factor are decreased in the pre-clinical stages of Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry* 93:1412-1421.
- Pennica D, Holmes WE, Kohr WJ, Harkins RN, Vehar GA, Ward CA, Bennett WF, Yelverton E, Seeburg PH, Heyneker HL, Goeddel DV, Collen D (1983) Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in *E. coli*. *Nature* 301:214-221.
- Perez MT, Caminos E (1995) Expression of brain-derived neurotrophic factor and of its functional receptor in neonatal and adult rat retina. *Neurosci Lett* 183:96-99.
- Petersen CM, Nielsen MS, Nykjaer A, Jacobsen L, Tommerup N, Rasmussen HH, Roigaard H, Gliemann J, Madsen P, Moestrup SK (1997) Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography. *The Journal of biological chemistry* 272:3599-3605.
- Petersen TE, Martzen MR, Ichinose A, Davie EW (1990) Characterization of the gene for human plasminogen, a key proenzyme in the fibrinolytic system. *The Journal of biological chemistry* 265:6104-6111.
- Petsko GAaR, D. (2004) Protein Structure and Function. New Science Press.

- Phillips HS, Hains JM, Laramée GR, Rosenthal A, Winslow JW (1990) Widespread expression of BDNF but not NT3 by target areas of basal forebrain cholinergic neurons. *Science* 250:290-294.
- Pikula A, Beiser AS, Chen TC, Preis SR, Vargias D, DeCarli C, Au R, Kelly-Hayes M, Kase CS, Wolf PA, Vasani RS, Seshadri S (2013) Serum brain-derived neurotrophic factor and vascular endothelial growth factor levels are associated with risk of stroke and vascular brain injury: Framingham Study. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 44:2768-2775.
- Pittman RN, Ivins JK, Buettner HM (1989) Neuronal plasminogen activators: cell surface binding sites and involvement in neurite outgrowth. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 9:4269-4286.
- Planas AM, Gorina R, Chamorro A (2006) Signalling pathways mediating inflammatory responses in brain ischaemia. *Biochemical Society transactions* 34:1267-1270.
- Ploughman M, Windle V, MacLellan CL, White N, Dore JJ, Corbett D (2009) Brain-derived neurotrophic factor contributes to recovery of skilled reaching after focal ischemia in rats. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 40:1490-1495.
- Polavarapu R, Gongora MC, Yi H, Ranganathan S, Lawrence DA, Strickland D, Yepes M (2007) Tissue-type plasminogen activator-mediated shedding of astrocytic low-density lipoprotein receptor-related protein increases the permeability of the neurovascular unit. *Blood* 109:3270-3278.
- Potempa J, Korzus E, Travis J (1994) The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation. *The Journal of biological chemistry* 269:15957-15960.
- Pradeep H, Diya JB, Shashikumar S, Rajanikant GK (2012) Oxidative stress--assassin behind the ischemic stroke. *Folia neuropathologica / Association of Polish Neuropathologists and Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences* 50:219-230.
- Prakash Y, Thompson MA, Meuchel L, Pabelick CM, Mantilla CB, Zaidi S, Martin RJ (2010) Neurotrophins in lung health and disease. *Expert Rev Respir Med* 4:395-411.
- Prigent-Tessier A, Quirio A, Maguin-Gate K, Szostak J, Mossiat C, Nappey M, Devaux S, Marie C, Demougeot C (2013) Physical training and hypertension have opposite effects on endothelial brain-derived neurotrophic factor expression. *Cardiovascular research* 100:374-382.
- Pruunsild P, Sepp M, Orav E, Koppel I, Timmusk T (2011) Identification of cis-elements and transcription factors regulating neuronal activity-dependent transcription of human BDNF gene. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:3295-3308.
- Qian Z, Gilbert ME, Colicos MA, Kandel ER, Kuhl D (1993) Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate-early gene during seizure, kindling and long-term potentiation. *Nature* 361:453-457.
- Qin L, Kim E, Ratan R, Lee FS, Cho S (2011) Genetic variant of BDNF (Val66Met) polymorphism attenuates stroke-induced angiogenic responses by enhancing anti-angiogenic mediator CD36 expression. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:775-783.
- Quinn TJ, Lees KR (2009) Hyperglycaemia in acute stroke--to treat or not to treat. *Cerebrovasc Dis* 27 Suppl 1:148-155.
- Quirio A, Demougeot C, Bertrand N, Mossiat C, Garnier P, Marie C, Prigent-Tessier A (2013) Effect of stroke on arginase expression and localization in the rat brain. *The European journal of neuroscience* 37:1193-1202.
- Quirio A, Hervieu M, Garnier P, Demougeot C, Mossiat C, Bertrand N, Martin A, Marie C, Prigent-Tessier A (2012) Comparative effect of treadmill exercise on mature BDNF production in control versus stroke rats. *PloS one* 7:e44218.
- Rasmussen P, Brassard P, Adser H, Pedersen MV, Leick L, Hart E, Secher NH, Pedersen BK, Pilegaard H (2009) Evidence for a release of brain-derived neurotrophic factor from the brain during exercise. *Experimental physiology* 94:1062-1069.
- Reichardt LF (2006) Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361:1545-1564.

- Reijerkerk A, Kooij G, van der Pol SM, Leyen T, Lakeman K, van Het Hof B, Vivien D, de Vries HE (2010) The NR1 subunit of NMDA receptor regulates monocyte transmigration through the brain endothelial cell barrier. *Journal of neurochemistry* 113:447-453.
- Renatus M, Bode W, Huber R, Sturzebecher J, Prasa D, Fischer S, Kohnert U, Stubbs MT (1997) Structural mapping of the active site specificity determinants of human tissue-type plasminogen activator. Implications for the design of low molecular weight substrates and inhibitors. *The Journal of biological chemistry* 272:21713-21719.
- Ricci A, Felici L, Mariotta S, Mannino F, Schmid G, Terzano C, Cardillo G, Amenta F, Bronzetti E (2004) Neurotrophin and neurotrophin receptor protein expression in the human lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30:12-19.
- Ricci A, Greco S, Amenta F, Bronzetti E, Felici L, Rossodivita I, Sabbatini M, Mariotta S (2000) Neurotrophins and neurotrophin receptors in human pulmonary arteries. *J Vasc Res* 37:355-363.
- Rickhag M, Teilmann M, Wieloch T (2007) Rapid and long-term induction of effector immediate early genes (BDNF, Neuritin and Arc) in peri-infarct cortex and dentate gyrus after ischemic injury in rat brain. *Brain research* 1151:203-210.
- Rijken DC, Groeneveld E (1986) Isolation and functional characterization of the heavy and light chains of human tissue-type plasminogen activator. *The Journal of biological chemistry* 261:3098-3102.
- Rijken DC, Hoylaerts M, Collen D (1982) Fibrinolytic properties of one-chain and two-chain human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator. *The Journal of biological chemistry* 257:2920-2925.
- Rijken DC, Otter M, Kuiper J, van Berkel TJ (1990) Receptor-mediated endocytosis of tissue-type plasminogen activator (t-PA) by liver cells. *Thrombosis research Supplement* 10:63-71.
- Rijken DC, Wijngaards G, Zaal-de Jong M, Welbergen J (1979) Purification and partial characterization of plasminogen activator from human uterine tissue. *Biochimica et biophysica acta* 580:140-153.
- Ringleb P, Schellinger PD, Hacke W, Europaischen S (2008) [European Stroke Organisation 2008 guidelines for managing acute cerebral infarction or transient ischemic attack. Part 1]. *Der Nervenarzt* 79:936-957.
- Robinson TG, Dawson SL, Ahmed U, Manktelow B, Fotherby MD, Potter JF (2001) Twenty-four hour systolic blood pressure predicts long-term mortality following acute stroke. *Journal of hypertension* 19:2127-2134.
- Rochlitz S, Nassenstein C, Braun A (2006) The contribution of neurotrophins to the pathogenesis of allergic asthma. *Biochem Soc Trans* 34:594-599.
- Rodier M, Prigent-Tessier A, Bejot Y, Jacquin A, Mossiat C, Marie C, Garnier P (2014) Exogenous t-PA Administration Increases Hippocampal Mature BDNF Levels. Plasmin- or NMDA-Dependent Mechanism? *PloS one* 9:e92416.
- Rogove AD, Siao C, Keyt B, Strickland S, Tsirka SE (1999) Activation of microglia reveals a non-proteolytic cytokine function for tissue plasminogen activator in the central nervous system. *Journal of cell science* 112 (Pt 22):4007-4016.
- Rosenfeld RD, Zeni L, Haniu M, Talvenheimo J, Radka SF, Bennett L, Miller JA, Welcher AA (1995) Purification and identification of brain-derived neurotrophic factor from human serum. *Protein expression and purification* 6:465-471.
- Rouf SA, Moo-Young M, Chisti Y (1996) Tissue-type plasminogen activator: characteristics, applications and production technology. *Biotechnology advances* 14:239-266.
- Roy-O'Reilly M, McCullough LD (2014) Sex differences in stroke: The contribution of coagulation. *Experimental neurology*.
- Russo-Neustadt A, Beard RC, Cotman CW (1999) Exercise, antidepressant medications, and enhanced brain derived neurotrophic factor expression. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 21:679-682.

- Sacco RL, Liao JK (2005) Drug Insight: statins and stroke. *Nature clinical practice Cardiovascular medicine* 2:576-584.
- Saha RN, Liu X, Pahan K (2006) Up-regulation of BDNF in astrocytes by TNF-alpha: a case for the neuroprotective role of cytokine. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* 1:212-222.
- Salter K, Jutai J, Hartley M, Foley N, Bhogal S, Bayona N, Teasell R (2006) Impact of early vs delayed admission to rehabilitation on functional outcomes in persons with stroke. *Journal of rehabilitation medicine* 38:113-117.
- Samson AL, Medcalf RL (2006) Tissue-type plasminogen activator: a multifaceted modulator of neurotransmission and synaptic plasticity. *Neuron* 50:673-678.
- Samson AL, Nevin ST, Croucher D, Niego B, Daniel PB, Weiss TW, Moreno E, Monard D, Lawrence DA, Medcalf RL (2008) Tissue-type plasminogen activator requires a co-receptor to enhance NMDA receptor function. *Journal of neurochemistry* 107:1091-1101.
- Sarret P, Krzywkowski P, Segal L, Nielsen MS, Petersen CM, Mazella J, Stroh T, Beaudet A (2003) Distribution of NTS3 receptor/sortilin mRNA and protein in the rat central nervous system. *The Journal of comparative neurology* 461:483-505.
- Sartori CR, Vieira AS, Ferrari EM, Langone F, Tongiorgi E, Parada CA (2011) The antidepressive effect of the physical exercise correlates with increased levels of mature BDNF, and proBDNF proteolytic cleavage-related genes, p11 and tPA. *Neuroscience* 180:9-18.
- Sartorius A, Hellweg R, Litzke J, Vogt M, Dormann C, Vollmayr B, Danker-Hopfe H, Gass P (2009) Correlations and discrepancies between serum and brain tissue levels of neurotrophins after electroconvulsive treatment in rats. *Pharmacopsychiatry* 42:270-276.
- Sato Y, Chin Y, Kato T, Tanaka Y, Tozuka Y, Mase M, Ageyama N, Ono F, Terao K, Yoshikawa Y, Hisatsune T (2009) White matter activated glial cells produce BDNF in a stroke model of monkeys. *Neuroscience research* 65:71-78.
- Schabitz WR, Berger C, Kollmar R, Seitz M, Tanay E, Kiessling M, Schwab S, Sommer C (2004) Effect of brain-derived neurotrophic factor treatment and forced arm use on functional motor recovery after small cortical ischemia. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 35:992-997.
- Schabitz WR, Schwab S, Spranger M, Hacke W (1997) Intraventricular brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size after focal cerebral ischemia in rats. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 17:500-506.
- Schabitz WR, Sommer C, Zoder W, Kiessling M, Schwaninger M, Schwab S (2000) Intravenous brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size and counterregulates Bax and Bcl-2 expression after temporary focal cerebral ischemia. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 31:2212-2217.
- Schabitz WR, Steigleder T, Cooper-Kuhn CM, Schwab S, Sommer C, Schneider A, Kuhn HG (2007) Intravenous brain-derived neurotrophic factor enhances poststroke sensorimotor recovery and stimulates neurogenesis. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 38:2165-2172.
- Schaller J, Gerber SS (2011) The plasmin-antiplasmin system: structural and functional aspects. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 68:785-801.
- Schiemanck SK, Post MW, Kwakkel G, Witkamp TD, Kappelle LJ, Prevo AJ (2005) Ischemic lesion volume correlates with long-term functional outcome and quality of life of middle cerebral artery stroke survivors. *Restorative neurology and neuroscience* 23:257-263.
- Schlue WR, Dorner R (1992) The regulation of pH in the central nervous system. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 70 Suppl:S278-285.
- Seeds NW, Basham ME, Haffke SP (1999) Neuronal migration is retarded in mice lacking the tissue plasminogen activator gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:14118-14123.
- Seeds NW, Williams BL, Bickford PC (1995) Tissue plasminogen activator induction in Purkinje neurons after cerebellar motor learning. *Science* 270:1992-1994.

- Segawa M, Morinobu S, Matsumoto T, Fuchikami M, Yamawaki S (2013) Electroconvulsive seizure, but not imipramine, rapidly up-regulates pro-BDNF and t-PA, leading to mature BDNF production, in the rat hippocampus. *Int J Neuropsychopharmacol* 16:339-350.
- Seo MK, Lee CH, Cho HY, Lee JG, Lee BJ, Kim JE, Seol W, Kim YH, Park SW (2014) Effects of antidepressant drugs on synaptic protein levels and dendritic outgrowth in hippocampal neuronal cultures. *Neuropharmacology* 79:222-233.
- Shah MV (2006) Rehabilitation of the older adult with stroke. *Clinics in geriatric medicine* 22:469-489; xi.
- Sheehan JJ, Zhou C, Gravanis I, Rogove AD, Wu YP, Bogenhagen DF, Tsirka SE (2007) Proteolytic activation of monocyte chemoattractant protein-1 by plasmin underlies excitotoxic neurodegeneration in mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:1738-1745.
- Shelton FD, Volpe BT, Reding M (2001) Motor impairment as a predictor of functional recovery and guide to rehabilitation treatment after stroke. *Neurorehabilitation and neural repair* 15:229-237.
- Sheng M, Cummings J, Roldan LA, Jan YN, Jan LY (1994) Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature* 368:144-147.
- Shieh PB, Ghosh A (1999) Molecular mechanisms underlying activity-dependent regulation of BDNF expression. *Journal of neurobiology* 41:127-134.
- Shin CY, Kundel M, Wells DG (2004) Rapid, activity-induced increase in tissue plasminogen activator is mediated by metabotropic glutamate receptor-dependent mRNA translation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24:9425-9433.
- Siao CJ, Fernandez SR, Tsirka SE (2003) Cell type-specific roles for tissue plasminogen activator released by neurons or microglia after excitotoxic injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:3234-3242.
- Siao CJ, Tsirka SE (2002) Tissue plasminogen activator mediates microglial activation via its finger domain through annexin II. *J Neurosci* 22:3352-3358.
- Siesjo BK (1981) Cell damage in the brain: a speculative synthesis. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 1:155-185.
- Siesjo BK (1992) Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. *Journal of neurosurgery* 77:169-184.
- Simpson AJ, Booth NA, Moore NR, Bennett B (1991) Distribution of plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in tissues. *Journal of clinical pathology* 44:139-143.
- Siren AL, Fratelli M, Brines M, Goemans C, Casagrande S, Lewczuk P, Keenan S, Gleiter C, Pasquali C, Capobianco A, Mennini T, Heumann R, Cerami A, Ehrenreich H, Ghezzi P (2001) Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:4044-4049.
- Sjogren LS, Gan L, Doroudi R, Jern C, Jungersten L, Jern S (2000) Fluid shear stress increases the intracellular storage pool of tissue-type plasminogen activator in intact human conduit vessels. *Thrombosis and haemostasis* 84:291-298.
- Skaper SD (2008) The biology of neurotrophins, signalling pathways, and functional peptide mimetics of neurotrophins and their receptors. *CNS & neurological disorders drug targets* 7:46-62.
- Smith BO, Downing AK, Driscoll PC, Dudgeon TJ, Campbell ID (1995) The solution structure and backbone dynamics of the fibronectin type I and epidermal growth factor-like pair of modules of tissue-type plasminogen activator. *Structure* 3:823-833.
- Smith DT, Hoetzer GL, Greiner JJ, Stauffer BL, DeSouza CA (2003) Endothelial release of tissue-type plasminogen activator in the human forearm: role of nitric oxide. *Journal of cardiovascular pharmacology* 42:311-314.

- Sommer C, Schomacher M, Berger C, Kuhnert K, Muller HD, Schwab S, Schabitz WR (2006) Neuroprotective cannabinoid receptor antagonist SR141716A prevents downregulation of excitotoxic NMDA receptors in the ischemic penumbra. *Acta neuropathologica* 112:277-286.
- Stangl K, Stangl V (2010) The ubiquitin-proteasome pathway and endothelial (dys)function. *Cardiovascular research* 85:281-290.
- Stein CM, Brown N, Vaughan DE, Lang CC, Wood AJ (1998) Regulation of local tissue-type plasminogen activator release by endothelium-dependent and endothelium-independent agonists in human vasculature. *Journal of the American College of Cardiology* 32:117-122.
- Stoilov P, Castren E, Stamm S (2002) Analysis of the human TrkB gene genomic organization reveals novel TrkB isoforms, unusual gene length, and splicing mechanism. *Biochemical and biophysical research communications* 290:1054-1065.
- Stroemer RP, Kent TA, Hulsebosch CE (1998) Enhanced neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery with D-amphetamine therapy after neocortical infarction in rats. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 29:2381-2393; discussion 2393-2385.
- Strong K, Mathers C, Bonita R (2007) Preventing stroke: saving lives around the world. *Lancet neurology* 6:182-187.
- Su EJ, Fredriksson L, Geyer M, Folestad E, Cale J, Andrae J, Gao Y, Pietras K, Mann K, Yepes M, Strickland DK, Betsholtz C, Eriksson U, Lawrence DA (2008) Activation of PDGF-CC by tissue plasminogen activator impairs blood-brain barrier integrity during ischemic stroke. *Nature medicine* 14:731-737.
- Sulejczak D, Ziemińska E, Czarkowska-Bauch J, Nosecka E, Strzalkowski R, Skup M (2007) Focal photothrombotic lesion of the rat motor cortex increases BDNF levels in motor-sensory cortical areas not accompanied by recovery of forelimb motor skills. *Journal of neurotrauma* 24:1362-1377.
- Suzuki Y (2010) Role of tissue-type plasminogen activator in ischemic stroke. *Journal of pharmacological sciences* 113:203-207.
- Suzuki Y, Nagai N, Umemura K, Collen D, Lijnen HR (2007) Stromelysin-1 (MMP-3) is critical for intracranial bleeding after t-PA treatment of stroke in mice. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 5:1732-1739.
- Suzuki Y, Nagai N, Yamakawa K, Kawakami J, Lijnen HR, Umemura K (2009) Tissue-type plasminogen activator (t-PA) induces stromelysin-1 (MMP-3) in endothelial cells through activation of lipoprotein receptor-related protein. *Blood* 114:3352-3358.
- Szydłowska K, Tymianski M (2010) Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell calcium* 47:122-129.
- Tabuchi A, Sakaya H, Kisukeda T, Fushiki H, Tsuda M (2002) Involvement of an upstream stimulatory factor as well as cAMP-responsive element-binding protein in the activation of brain-derived neurotrophic factor gene promoter I. *The Journal of biological chemistry* 277:35920-35931.
- Takemoto M, Liao JK (2001) Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 21:1712-1719.
- Takeuchi N, Chuma T, Matsuo Y, Watanabe I, Ikoma K (2005) Repetitive transcranial magnetic stimulation of contralesional primary motor cortex improves hand function after stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 36:2681-2686.
- Tanaka Y, Marumo T, Omura T, Yoshida S (2007) Serum S100B indicates successful combination treatment with recombinant tissue plasminogen activator and MK-801 in a rat model of embolic stroke. *Brain research* 1154:194-199.
- Tao X, West AE, Chen WG, Corfas G, Greenberg ME (2002) A calcium-responsive transcription factor, CaRF, that regulates neuronal activity-dependent expression of BDNF. *Neuron* 33:383-395.
- Tapia-Arancibia L, Rage F, Givalois L, Arancibia S (2004) Physiology of BDNF: focus on hypothalamic function. *Frontiers in neuroendocrinology* 25:77-107.
- Tei H, Uchiyama S, Usui T (2006) Predictors of good prognosis in total anterior circulation infarction within 6 h after onset under conventional therapy. *Acta neurologica Scandinavica* 113:301-306.

- Teng F, Beray-Berthat V, Coqueran B, Lesbats C, Kuntz M, Palmier B, Garraud M, Bedfert C, Slane N, Berezowski V, Szeremeta F, Hachani J, Scherman D, Plotkine M, Doan BT, Marchand-Leroux C, Margail I (2013) Prevention of rt-PA induced blood-brain barrier component degradation by the poly(ADP-ribose)polymerase inhibitor PJ34 after ischemic stroke in mice. *Experimental neurology* 248:416-428.
- Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD, Kermani P, Torkin R, Chen ZY, Lee FS, Kraemer RT, Nykjaer A, Hempstead BL (2005) ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:5455-5463.
- Thelwell C, Longstaff C (2007) The regulation by fibrinogen and fibrin of tissue plasminogen activator kinetics and inhibition by plasminogen activator inhibitor 1. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 5:804-811.
- Timmusk T, Lendahl U, Funakoshi H, Arenas E, Persson H, Metsis M (1995) Identification of brain-derived neurotrophic factor promoter regions mediating tissue-specific, axotomy-, and neuronal activity-induced expression in transgenic mice. *The Journal of cell biology* 128:185-199.
- Timmusk T, Palm K, Lendahl U, Metsis M (1999) Brain-derived neurotrophic factor expression in vivo is under the control of neuron-restrictive silencer element. *The Journal of biological chemistry* 274:1078-1084.
- Timmusk T, Palm K, Metsis M, Reintam T, Paalme V, Saarma M, Persson H (1993) Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene. *Neuron* 10:475-489.
- Tongiorgi E (2008) Activity-dependent expression of brain-derived neurotrophic factor in dendrites: facts and open questions. *Neuroscience research* 61:335-346.
- Trajkovska V, Marcussen AB, Vinberg M, Hartvig P, Aznar S, Knudsen GM (2007) Measurements of brain-derived neurotrophic factor: methodological aspects and demographical data. *Brain research bulletin* 73:143-149.
- Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R (2010) Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological reviews* 62:405-496.
- Tsirka SE, Gualandris A, Amaral DG, Strickland S (1995) Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator. *Nature* 377:340-344.
- Tsuji K, Aoki T, Tejima E, Arai K, Lee SR, Atochin DN, Huang PL, Wang X, Montaner J, Lo EH (2005) Tissue plasminogen activator promotes matrix metalloproteinase-9 upregulation after focal cerebral ischemia. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 36:1954-1959.
- Tsukahara T, Yonekawa Y, Tanaka K, Ohara O, Wantanabe S, Kimura T, Nishijima T, Taniguchi T (1994) The role of brain-derived neurotrophic factor in transient forebrain ischemia in the rat brain. *Neurosurgery* 34:323-331; discussion 331.
- Tsukinoki K, Saruta J, Sasaguri K, Miyoshi Y, Jinbu Y, Kusama M, Sato S, Watanabe Y (2006) Immobilization stress induces BDNF in rat submandibular glands. *J Dent Res* 85:844-848.
- Uchida H, Yokoyama H, Kimoto H, Kato H, Araki T (2010) Long-term changes in the ipsilateral substantia nigra after transient focal cerebral ischaemia in rats. *International journal of experimental pathology* 91:256-266.
- Uchiyama Y, Koike M, Shibata M (2008) Autophagic neuron death in neonatal brain ischemia/hypoxia. *Autophagy* 4:404-408.
- Umemura K, Higo K, Sakata T, Yuki S, Iwata K, Yamaguchi K (2008) Effects of alteplase, a thrombolytic agent, in a rat photothrombotic middle cerebral artery occlusion model. *Pathophysiology of haemostasis and thrombosis* 36:245-250.
- Urano S, Metzger AR, Castellino FJ (1989) Plasmin-mediated fibrinolysis by variant recombinant tissue plasminogen activators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86:2568-2571.

- Vaidya VA, Marek GJ, Aghajanian GK, Duman RS (1997) 5-HT_{2A} receptor-mediated regulation of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the hippocampus and the neocortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17:2785-2795.
- Van De Craen B, Declerck PJ, Gils A (2012) The Biochemistry, Physiology and Pathological roles of PAI-1 and the requirements for PAI-1 inhibition in vivo. *Thrombosis research* 130:576-585.
- van den Eijnden-Schrauwen Y, Kooistra T, de Vries RE, Emeis JJ (1995) Studies on the acute release of tissue-type plasminogen activator from human endothelial cells in vitro and in rats in vivo: evidence for a dynamic storage pool. *Blood* 85:3510-3517.
- Vanderlugt CL, Rahbe SM, Elliott PJ, Dal Canto MC, Miller SD (2000) Treatment of established relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis with the proteasome inhibitor PS-519. *Journal of autoimmunity* 14:205-211.
- Verstraete M, Bounameaux H, de Cock F, Van de Werf F, Collen D (1985) Pharmacokinetics and systemic fibrinogenolytic effects of recombinant human tissue-type plasminogen activator (rt-PA) in humans. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 235:506-512.
- Vivien D, Buisson A (2000) Serine protease inhibitors: novel therapeutic targets for stroke? *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 20:755-764.
- Vivien D, Gauberti M, Montagne A, Defer G, Touze E (2011) Impact of tissue plasminogen activator on the neurovascular unit: from clinical data to experimental evidence. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 31:2119-2134.
- Wahlgren N, Ahmed N, Davalos A, Ford GA, Grond M, Hacke W, Hennerici MG, Kaste M, Kuelkens S, Larrue V, Lees KR, Roine RO, Soinne L, Toni D, Vanhooren G, investigators S-M (2007) Thrombolysis with alteplase for acute ischaemic stroke in the Safe Implementation of Thrombolysis in Stroke-Monitoring Study (SITS-MOST): an observational study. *Lancet* 369:275-282.
- Wang Q, Tang XN, Yenari MA (2007a) The inflammatory response in stroke. *Journal of neuroimmunology* 184:53-68.
- Wang S, Lee SR, Guo SZ, Kim WJ, Montaner J, Wang X, Lo EH (2006) Reduction of tissue plasminogen activator-induced matrix metalloproteinase-9 by simvastatin in astrocytes. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 37:1910-1912.
- Wang X, Fan X, Yu Z, Liao Z, Zhao J, Mandeville E, Guo S, Lo EH, Wang X (2014) Effects of tissue plasminogen activator and annexin A2 combination therapy on long-term neurological outcomes of rat focal embolic stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 45:619-622.
- Wang X, Lee SR, Arai K, Tsuji K, Rebeck GW, Lo EH (2003) Lipoprotein receptor-mediated induction of matrix metalloproteinase by tissue plasminogen activator. *Nat Med* 9:1313-1317.
- Wang Y, Han R, Liang ZQ, Wu JC, Zhang XD, Gu ZL, Qin ZH (2008) An autophagic mechanism is involved in apoptotic death of rat striatal neurons induced by the non-N-methyl-D-aspartate receptor agonist kainic acid. *Autophagy* 4:214-226.
- Wang Y, Zhang ZG, Rhodes K, Renzi M, Zhang RL, Kapke A, Lu M, Pool C, Heavner G, Chopp M (2007b) Post-ischemic treatment with erythropoietin or carbamylated erythropoietin reduces infarction and improves neurological outcome in a rat model of focal cerebral ischemia. *British journal of pharmacology* 151:1377-1384.
- Wardlaw JM, Murray V, Berge E, del Zoppo G, Sandercock P, Lindley RL, Cohen G (2012) Recombinant tissue plasminogen activator for acute ischaemic stroke: an updated systematic review and meta-analysis. *Lancet* 379:2364-2372.
- Watanabe M, Inoue Y, Sakimura K, Mishina M (1992) Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs. *Neuroreport* 3:1138-1140.
- Watkins JC, Davies J, Evans RH, Francis AA, Jones AW (1981) Pharmacology of receptors for excitatory amino acids. *Advances in biochemical psychopharmacology* 27:263-273.
- Weimar C, König IR, Kraywinkel K, Ziegler A, Diener HC, German Stroke Study C (2004) Age and National Institutes of Health Stroke Scale Score within 6 hours after onset are accurate

- predictors of outcome after cerebral ischemia: development and external validation of prognostic models. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 35:158-162.
- Weinstein G, Beiser AS, Choi SH, Preis SR, Chen TC, Vorgas D, Au R, Pikula A, Wolf PA, DeStefano AL, Vasan RS, Seshadri S (2014) Serum brain-derived neurotrophic factor and the risk for dementia: the Framingham Heart Study. *JAMA neurology* 71:55-61.
- West AE, Chen WG, Dalva MB, Dolmetsch RE, Kornhauser JM, Shaywitz AJ, Takasu MA, Tao X, Greenberg ME (2001) Calcium regulation of neuronal gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:11024-11031.
- Wetmore C, Ernfors P, Persson H, Olson L (1990) Localization of brain-derived neurotrophic factor mRNA to neurons in the brain by in situ hybridization. *Experimental neurology* 109:141-152.
- Whiteley W, Jackson C, Lewis S, Lowe G, Rumley A, Sandercock P, Wardlaw J, Dennis M, Sudlow C (2009) Inflammatory markers and poor outcome after stroke: a prospective cohort study and systematic review of interleukin-6. *PLoS medicine* 6:e1000145.
- Willmot M, Leonardi-Bee J, Bath PM (2004) High blood pressure in acute stroke and subsequent outcome: a systematic review. *Hypertension* 43:18-24.
- Windle V, Corbett D (2005) Fluoxetine and recovery of motor function after focal ischemia in rats. *Brain research* 1044:25-32.
- Wolf BB, Lopes MB, VandenBerg SR, Gonias SL (1992) Characterization and immunohistochemical localization of alpha 2-macroglobulin receptor (low-density lipoprotein receptor-related protein) in human brain. *The American journal of pathology* 141:37-42.
- Woo NH, Teng HK, Siao CJ, Chiaruttini C, Pang PT, Milner TA, Hempstead BL, Lu B (2005) Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nature neuroscience* 8:1069-1077.
- Wu D, Pardridge WM (1999) Neuroprotection with noninvasive neurotrophin delivery to the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:254-259.
- Yamamoto M, Sobue G, Yamamoto K, Terao S, Mitsuma T (1996) Expression of mRNAs for neurotrophic factors (NGF, BDNF, NT-3, and GDNF) and their receptors (p75NGFR, trkA, trkB, and trkC) in the adult human peripheral nervous system and nonneural tissues. *Neurochem Res* 21:929-938.
- Yamamoto N, Sawada H, Izumi Y, Kume T, Katsuki H, Shimohama S, Akaike A (2007) Proteasome inhibition induces glutathione synthesis and protects cells from oxidative stress: relevance to Parkinson disease. *The Journal of biological chemistry* 282:4364-4372.
- Yamashita K, Wiessner C, Lindholm D, Thoenen H, Hossmann KA (1997) Post-occlusion treatment with BDNF reduces infarct size in a model of permanent occlusion of the middle cerebral artery in rat. *Metabolic brain disease* 12:271-280.
- Yamashita T, Fujitani M, Hata K, Mimura F, Yamagishi S (2005) Diverse functions of the p75 neurotrophin receptor. *Anatomical science international* 80:37-41.
- Yang J, Siao CJ, Nagappan G, Marinic T, Jing D, McGrath K, Chen ZY, Mark W, Tessarollo L, Lee FS, Lu B, Hempstead BL (2009) Neuronal release of proBDNF. *Nature neuroscience* 12:113-115.
- Yang JT, Chang CN, Lee TH, Hsu JC, Lin TN, Hsu YH, Hsieh Wu J (2002) Effect of dexamethasone on the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 messenger ribonucleic acids after forebrain ischemia in the rat. *Critical care medicine* 30:913-918.
- Yang L, Zhang Z, Sun D, Xu Z, Yuan Y, Zhang X, Li L (2011) Low serum BDNF may indicate the development of PSD in patients with acute ischemic stroke. *International journal of geriatric psychiatry* 26:495-502.
- Yang YR, Wang RY, Wang PS (2003) Early and late treadmill training after focal brain ischemia in rats. *Neuroscience letters* 339:91-94.
- Yao H, Haddad GG (2004) Calcium and pH homeostasis in neurons during hypoxia and ischemia. *Cell calcium* 36:247-255.

- Yeh CM, Huang CC, Hsu KS (2012) Prenatal stress alters hippocampal synaptic plasticity in young rat offspring through preventing the proteolytic conversion of pro-brain-derived neurotrophic factor (BDNF) to mature BDNF. *The Journal of physiology* 590:991-1010.
- Yenari MA, Xu L, Tang XN, Qiao Y, Giffard RG (2006) Microglia potentiate damage to blood-brain barrier constituents: improvement by minocycline in vivo and in vitro. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 37:1087-1093.
- Yepes M, Roussel BD, Ali C, Vivien D (2009) Tissue-type plasminogen activator in the ischemic brain: more than a thrombolytic. *Trends in neurosciences* 32:48-55.
- Yepes M, Sandkvist M, Moore EG, Bugge TH, Strickland DK, Lawrence DA (2003) Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein. *The Journal of clinical investigation* 112:1533-1540.
- Yepes M, Sandkvist M, Wong MK, Coleman TA, Smith E, Cohan SL, Lawrence DA (2000) Neuroserpin reduces cerebral infarct volume and protects neurons from ischemia-induced apoptosis. *Blood* 96:569-576.
- Young IS, Woodside JV (2001) Antioxidants in health and disease. *Journal of clinical pathology* 54:176-186.
- Zacco A, Togo J, Spence K, Ellis A, Lloyd D, Furlong S, Piser T (2003) 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors protect cortical neurons from excitotoxicity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:11104-11111.
- Zafra F, Castren E, Thoenen H, Lindholm D (1991) Interplay between glutamate and gamma-aminobutyric acid transmitter systems in the physiological regulation of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor synthesis in hippocampal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:10037-10041.
- Zafra F, Hengeler B, Leibrock J, Thoenen H, Lindholm D (1990) Activity dependent regulation of BDNF and NGF mRNAs in the rat hippocampus is mediated by non-NMDA glutamate receptors. *The EMBO journal* 9:3545-3550.
- Zhang C, An J, Haile WB, Echeverry R, Strickland DK, Yepes M (2009) Microglial low-density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates the effect of tissue-type plasminogen activator on matrix metalloproteinase-9 activity in the ischemic brain. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 29:1946-1954.
- Zhang L, Zhang ZG, Buller B, Jiang J, Jiang Y, Zhao D, Liu X, Morris D, Chopp M (2010) Combination treatment with VELCADE and low-dose tissue plasminogen activator provides potent neuroprotection in aged rats after embolic focal ischemia. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 41:1001-1007.
- Zhang L, Zhang ZG, Chopp M (2012) The neurovascular unit and combination treatment strategies for stroke. *Trends in pharmacological sciences* 33:415-422.
- Zhang L, Zhang ZG, Ding GL, Jiang Q, Liu X, Meng H, Hozeska A, Zhang C, Li L, Morris D, Zhang RL, Lu M, Chopp M (2005) Multitargeted effects of statin-enhanced thrombolytic therapy for stroke with recombinant human tissue-type plasminogen activator in the rat. *Circulation* 112:3486-3494.
- Zhang L, Zhang ZG, Liu X, Hozeska A, Stagliano N, Riordan W, Lu M, Chopp M (2006) Treatment of embolic stroke in rats with bortezomib and recombinant human tissue plasminogen activator. *Thrombosis and haemostasis* 95:166-173.
- Zhang L, Zhang ZG, Zhang RL, Lu M, Adams J, Elliott PJ, Chopp M (2001) Postischemic (6-Hour) treatment with recombinant human tissue plasminogen activator and proteasome inhibitor PS-519 reduces infarction in a rat model of embolic focal cerebral ischemia. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 32:2926-2931.
- Zhang X, Polavarapu R, She H, Mao Z, Yepes M (2007) Tissue-type plasminogen activator and the low-density lipoprotein receptor-related protein mediate cerebral ischemia-induced nuclear factor-kappaB pathway activation. *Am J Pathol* 171:1281-1290.

- Zhang Z, Zhang L, Yepes M, Jiang Q, Li Q, Arniego P, Coleman TA, Lawrence DA, Chopp M (2002) Adjuvant treatment with neuroserpin increases the therapeutic window for tissue-type plasminogen activator administration in a rat model of embolic stroke. *Circulation* 106:740-745.
- Zhao LR, Mattsson B, Johansson BB (2000) Environmental influence on brain-derived neurotrophic factor messenger RNA expression after middle cerebral artery occlusion in spontaneously hypertensive rats. *Neuroscience* 97:177-184.
- Zhao LR, Risedal A, Wojcik A, Hejzlar J, Johansson BB, Kokaia Z (2001) Enriched environment influences brain-derived neurotrophic factor levels in rat forebrain after focal stroke. *Neuroscience letters* 305:169-172.
- Zhao Y, Dou J, Luo J, Li W, Chan HH, Cui W, Zhang H, Han R, Carlier PR, Zhang X, Han Y (2011) Neuroprotection against excitotoxic and ischemic insults by bis(12)-hupyrindone, a novel anti-acetylcholinesterase dimer, possibly via acting on multiple targets. *Brain research* 1421:100-109.
- Zhou Z, Lu T, Xu G, Yue X, Zhu W, Ma M, Liu W, Zhu S, Liu X (2011) Decreased serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is associated with post-stroke depression but not with BDNF gene Val66Met polymorphism. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC* 49:185-189.
- Zhu H, Fan X, Yu Z, Liu J, Murata Y, Lu J, Zhao S, Hajjar KA, Lo EH, Wang X (2010) Annexin A2 combined with low-dose tPA improves thrombolytic therapy in a rat model of focal embolic stroke. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 30:1137-1146.
- Zhu JM, Zhao YY, Chen SD, Zhang WH, Lou L, Jin X (2011) Functional recovery after transplantation of neural stem cells modified by brain-derived neurotrophic factor in rats with cerebral ischaemia. *The Journal of international medical research* 39:488-498.
- Zigova T, Pencea V, Wiegand SJ, Luskin MB (1998) Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb. *Molecular and cellular neurosciences* 11:234-245.
- Zittel S, Weiller C, Liepert J (2008) Citalopram improves dexterity in chronic stroke patients. *Neurorehabilitation and neural repair* 22:311-314.
- Zlokovic BV, Wang L, Sun N, Haffke S, Verrall S, Seeds NW, Fisher MJ, Schreiber SS (1995) Expression of tissue plasminogen activator in cerebral capillaries: possible fibrinolytic function of the blood-brain barrier. *Neurosurgery* 37:955-961.

Titre : Impact du t-PA sur les taux cérébraux de BDNF en conditions physiologiques, et sur les taux circulants en conditions ischémiques. Etudes chez l'Homme et chez l'animal.

Résumé

L'objectif de ce travail a été de tester l'hypothèse selon laquelle l'effet bénéfique de l'administration de la forme recombinante de l'activateur tissulaire du plasminogène (rt-PA) chez le patient victime d'un accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique ne résulte pas uniquement de son action fibrinolytique mais aussi de sa capacité à augmenter le brain-derived neurotrophic factor (BDNF) dans le cerveau. Dans ce but, nous avons conduit une première étude visant à évaluer chez l'animal sain, l'effet du rt-PA sur les taux cérébraux de BDNF. Dans une seconde approche, nous avons étudié l'effet du rt-PA sur les taux sériques de BDNF chez le patient victime d'un AVC ischémique et chez l'animal soumis à une ischémie cérébrale focale. Le sang a été prélevé chez l'Homme à l'admission (J0), J1, J7 et J90 après l'AVC, et chez le Rat avant et après (1h, 4h et 24h) l'ischémie. Le BDNF a été mesuré dans le cerveau par technique de Western blot et dans le sang par technique ELISA. Dans les deux études le rt-PA (Actilyse®) a été administré sous forme d'un bolus suivi d'une perfusion d'une heure. La première étude montre que 1) le rt-PA augmente les taux de BDNF dans l'hippocampe, 2) le traitement par MK801 (un antagoniste des récepteurs NMDA) mais pas par l'acide tranexamique (un inhibiteur de la plasmine) annule l'effet du rt-PA sur les taux de BDNF. La deuxième étude met en évidence que 1) la récupération neurologique est meilleure chez les patients recevant le rt-PA, 2) le traitement par rt-PA augmente les taux sériques de BDNF à J1 et J7 chez l'Homme, mais ne modifie pas les taux sanguins de BDNF chez l'animal, 3) les taux de BDNF ne sont pas corrélés à la récupération neurologique mais sont inversement corrélés au score cardiovasculaire du patient. En conclusion, nos résultats suggèrent que le rt-PA peut exercer un effet protecteur extra-fibrinolytique en augmentant les taux de BDNF par une potentialisation de l'activité glutamatergique. Même si le rt-PA induit une meilleure récupération neurologique et augmente les taux circulants de BDNF chez les patients victimes d'un AVC, l'absence de corrélation entre ces deux paramètres n'est pas en faveur de l'utilisation du BDNF circulant comme un marqueur prédictif de récupération neurologique, mais pourrait être un reflet de la capacité de l'endothélium à sécréter le BDNF.

Mots clés : rt-PA, BDNF, TrKB, NMDA, AVC, Récupération fonctionnelle, Santé cardiovasculaire.

Abstract

Our objective was to test the hypothesis that the beneficial effect of the administration of the recombinant form of tissue plasminogen activator (rt-PA) in ischemic stroke patient not only results from its fibrinolytic activity but also from its ability to increase brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the brain. To this end, we conducted an initial study to evaluate the effect of rt-PA on brain BDNF levels in healthy animals. In a second study, we investigated the effect of rt-PA on serum BDNF levels in ischemic stroke patients and in animals subjected to permanent focal cerebral ischemia. Blood samples were obtained from patient on admission (D0), D1, D7 and D90 after stroke and in rats before and after (1h, 4h and 24h) ischemia. BDNF was measured in the brain by Western blot and in the blood by ELISA. In both studies, the rt-PA (Actilyse®) was administered as a bolus followed by an infusion of one hour. The first study evidences that 1) rt-PA increases the BDNF levels in the hippocampus, 2) treatment with MK801 (a NMDA receptor antagonist) but not with tranexamic acid (a plasmin inhibitor) canceled the effect of rt-PA on BDNF levels. The second study exhibits that 1) neurological recovery was higher in the patients receiving rt-PA, 2) treatment with rt-PA increases serum BDNF at D1 and D7 in patients, but does not change the blood BDNF levels in animals, 3) BDNF levels are not correlated with neurological recovery but are inversely correlated to the patient cardiovascular score. In conclusion, our results suggest that rt-PA may have a protective extra-fibrinolytic effect by increasing in BDNF levels through a potentiation of glutamatergic pathway. Although rt-PA induces a better neurological recovery and increases circulating BDNF levels in stroke patients, the lack of correlation between these two parameters is not in favor of using circulating BDNF as a predictive marker of neurological recovery, but could be a reflect of the endothelium ability to synthesize BDNF.

Key words : rt-PA, BDNF, TrKB, NMDA, AVC, functional recovery, cardiovascular health status.